Repetitive DNA des Krallenfrosches Xenopus laevis

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

am

Fachbereich Chemie

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Wolfgang Meyerhof

aus Hannover

1984

UNIV.
LIBRARY
LIB.

Repetitive DNA des Krallenfrosches Xenopus laevis

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

am

Fachbereich Chemie

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Wolfgang Meyerhof

aus Hannover

1. Referent: Prof. Dr. Dr. Knöchel

2. Referent: Prof. Dr. Riedel

Tag der mündlichen Prüfung: 7.11.1984

Diese Arbeit wurde unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. W. Knöchel am Institut für Molekularbiologie und Biochemie der Freien Universität Berlin angefertigt. Herrn Prof. Dr. Dr. W. Knöchel danke ich für die Überlassung des Themas, sowie für viele wertvolle Anregungen. Weiterhin danke ich meinen Kolleginnen S. Hummel für die ausgezeichnete Unterstützung bei den Arbeiten über die REM Sequenzen und Dr. B. Tappeser für die Hilfe bei der Sequenzierung der RHM5 Sequenz. Mein Dank gilt auch E. Korge für die Durchführung der in - situ Hybridisierungen. I. Ziglowsky danke ich für die vorzügliche experimentelle Hilfe im Verlauf dieser Arbeit. Der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Sonderforschungsbereich Embryonale Entwicklung und Differenzierung, SFB 29) danke ich für die zur Verfügung gestellten Mittel.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548817_0015

Im Text gebrauchte Abkürzungen:

ABM Papier	m-Aminobenzyloxymethyl-Papier
BP	Basenpaare
cDNA	copy Desoxyribonucleinsäure
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DBM Papier	Diazobenzyloxymethyl-Papier
dATP	2'-Desoxy-adenosin-5'-triphosphat
dCTP	2'-Desoxy-cytidin-5'-triphosphat
dGTP	2'-Desoxy-guanosin-5'-triphosphat
dTTP	2'-Desoxy-thymidin-5'-triphosphat
ddATP	2', 3'-Didesoxy-adenosin-5'-triphosphat
ddCTP	2', 3'-Didesoxy-cytidin-5'-triphosphat
ddGTP	2', 3'-Didesoxy-guanosin-5'-triphosphat
ddTTP	2', 3'-Didesoxy-thymidin-5'-triphosphat
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
REM	Repetitives Eco RI Monomer
RHM	Repetitives Hind III Monomer
KBP	Kilobasenpaare
rpm	Umdrehungen pro Minute
RF DNA	replikative Form von Phagen DNA
RNA	Ribonucleinsäure
mRNA	messenger Ribonucleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonucleinsäure
tRNA	Transfer Ribonucleinsäure
RNAse A	Ribonuclease A

SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	0,15 M NaCl, 0,015 M Na-citrat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung und Problemstellung	1
2.	Experimentelles	9
2.1	Chemikalien und Materialien	9
2.2	Tiere und Gewinnen von Laich	10
2.3	RNA Isolierung	11
2.3.1	Isolierung der Zellkerne	11
2.3.2	Extraktion der Kern RNA	12
2.3.3	Isolierung der Polysomen	12
2.3.4	Extraktion polysomaler RNA	13
2.3.5	Isolierung polyadenylierter RNA Sequenzen	13
2.3.6	Isolierung gesamter, zellulärer RNA	13
2.4	Isolierung von DNA	14
2.4.1	Isolierung von Xenopus DNA aus Leber	14
2.4.2	Isolierung von M13 RF DNA und Plasmid DNA	15
2.4.3	Isolierung von M13 Einzelstrang DNA	17
2.5	Restriktionsverdauungen von DNA	17
2.6	Gelelektrophoresen	18
2.6.1	Agarosegele zur Trennung von DNA	18
2.6.2	Agarosegele zur Trennung von RNA	18
2.6.3	Formaldehyd - Agarosegele	19
2.6.4	Nichtdenaturierende Polyacrylamidgele	19
2.6.5	Strangtrennungsgele	20
2.6.6	Sequenzgele	20

		Seite
2.7	Isolierung von Nucleinsäuren aus Gelen	21
2.7.1	Elution von Nucleinsäuren aus Polyacylamidgelen	21
2.7.2	Elution von DNA aus Agarosegelen	22
2.8	Immobilisierung von Nucleinsäuren an Nitrocellulose	23
2.8.1	"Southern - Transfer"	23
2.8.2	"dot blots"	24
2.8.3	Immobilisierung von DNA aus Bakterienkolonien	24
2.9	Elektrotransfer von DNA aus Acrylamidgelen auf DBM Papier	25
2.10	Markierung von DNA	26
2.10.1	Nicktranslation	26
2.10.2	Synthese ^{32}p markierter cDNA	26
2.10.3	3' Endmarkierung mit Klenow - Polymerase	27
2.10.4	5' Endmarkierung mit T_4 - Polynucleotid - Kinase	27
2.10.5	3' Endmarkierung mit Terminaler Transferase	28
2.11	Hybridisierungen	28
2.12	DNA Sequenzierung nach Maxam und Gilbert	29
2.13	Sequenzieren nach der "Sanger - Methode"	30
2.14	Injektion von DNA in Oozyten	33
2.15	Klonierung in Plasmid pBR 322	34

		Seite
2.16	Klonierung in M13 - Phagen	35
2.17	In - situ Hybridisierung	36
3.	Ergebnisse	38
3.1	Die als cDNA klonierten repetitiven Elemente	38
3.1.1	Identifizierung von cDNA Klonen, die repetitive Elemente enthalten	38
3.1.2	Quantifizierung der als cDNA klonierten repetitiven Elemente	41
3.1.3	Genomorganisation der als cDNA klonierten repetitiven Elemente	46
3.1.4	Transkriptionsanalyse der klonierten repetitiven Elemente	50
3.1.5	Sequenzanalyse	55
3.2	Die REM Sequenzen	60
3.2.1	Identifizierung und Isolierung von REM Sequenzen	60
3.2.2	Nucleotidsequenzen der REM Sequenzen	63
3.2.3	Quantifizierung der REM Elemente	67
3.2.4	Genomorganisation der REM Sequenzen	67
3.2.5	Transkriptionsanalyse der REM Sequenzen	73
3.3	Die RHM Sequenzen	76
3.3.1	Identifizierung und Isolierung von RHM Sequenzen	76

		Seite
3.3.2	Quantifizierung der RHM2 Sequenz	82
3.3.3	Sequenzanalyse des RHM2 Fragmentes	86
3.3.4	Isolierung von Genom Fragmenten aus einer Cosmid Bibliothek	89
3.3.5	Sequenzanalyse des 1,05 KBP Monomers	94
3.3.6	Transkriptionsanalyse von RHM2 und RHM5	97
4.	Diskussion	103
4.1	Die als cDNA klonierten repetitiven Elemente	103
4.2	Die REM Sequenzen	111
4.3	Die RHM Sequenzen	115
5.	Zusammenfassung	129
6.	Literaturverzeichnis	132

1. Einleitung und Problemstellung

Die Analyse der Renaturierungskinetik geschmolzener DNA ermöglicht, die komplex organisierte Genom DNA von Eukaryonten je nach Häufigkeit einzelner DNA Sequenzen in Klassen zu unterteilen (Britten & Kohne, 1968). Es werden drei Häufigkeitsklassen unterschieden: (1) Einzelkopie Sequenzen (eine bis wenige Kopien pro haploidem Genom), (2) mittelrepetitive DNA (wenige bis 100000 Kopien pro haploidem Genom) und (3) hochrepetitive DNA (mehr als 100000 Kopien pro haploidem Genom). Einzelkopie Sequenzen codieren einen großen Anteil der Zellproteine, jedoch werden nicht alle Proteine von Einzelkopie Genen codiert und nicht alle "Klasse 1 Sequenzen" codieren Proteine. Der Anteil der Einzelkopie Sequenzen am Genom ist bei den diversen Spezies sehr unterschiedlich, wird aber im Durchschnitt mit 30% - 40% angegeben (Lewin, 1980). Die Klasse der mittelrepetitiven DNA enthält a) die Angehörigen der verschiedenartigen Multigenfamilien (z.B. rRNA Gene, Histongene, tRNA Gene, Actingene, Immungloulingene (eine Übersicht

geben Long und Dawid, 1980)), b) Sequenzfamilien* deren Mitglieder bis zur Nucleotidsequenz bekannt sind, über Bedeutung aber kein einheitliches Bild besteht und c) völlig uncharakterisierte Sequenzfamilien. Der Anteil der mittelrepetitiven DNA am Genom wird im allgemeinen mit etwa 30% - 50% angegeben (für Xenopus und Mensch je ca. 30%; Davidson et al., 1973; Schmid & Deininger, 1975). Die Klasse der hochrepetitiven DNA beinhaltet vielfach Palindrome und Satelliten DNA. Palindrome sind in sich komplementäre Sequenzen; folglich renaturieren sie spontan, d.h. im Vergleich mit Einzelkopie- und mittelrepetitiven Sequenzen sehr schnell und konzentrationsunabhängig. Daher finden sich palindromische oder invertierte Sequenzen in der Klasse der hochrepetitiven DNA unabhängig von der Häufigkeit mit der sie im Genom vertreten sind. Satelliten DNAs bestehen aus tandemartig aufgereihten, ähnlichen oder identischen monomeren Sequenzelementen. Die Monomere können 5 bis mehrere 100 BP lang sein und bis zu mehreren millionenmal vorkommen (Gall et al., 1973; siehe die Übersichten von Brutlag, 1980 und Singer, 1982). Der Anteil der hochrepetitiven DNA am Genom beträgt im allgemeinen knapp 10% (Lewin, 1980).

Die Art und Weise der Anordnung aller Mitglieder der genannten drei Häufigkeitsklassen im Genom bezeichnet man als Genomorganisation. Diese ist bei einer Vielzahl phylogene-

*Eine repetitive Sequenzfamilie ist definiert als die Gesamtheit miteinander kreuzhybridisierender Sequenzen; die Angehörigen einer Sequenzfamilie sind also ähnlich, müssen aber nicht identisch sein.

tisch sehr unterschiedlicher Organismen, wie Xenopus, Mensch, Seeigel, oder Dictyostelium weitgehend ähnlich. Ein großer Anteil dieser Genome (50% - 80%) zeigt ein als "Xenopus-Muster" oder als "kurzperiodisch alternierendes" Muster bezeichnete Struktur (Davidson, 1976), d.h. viele kurze repetitive Sequenzen von etwa 300 BP sind eingestreut in Einzelkopie DNA Bereiche von ungefähr 1000 - 2000 BP (Davidson et al., 1973; Chamberlin et al., 1975; Schmid & Deininger, 1975; Firtel & Kindle, 1975; Graham et al., 1974). Der verbleibende Anteil (20% - 50%) der Genome dieser Organismen weist zusätzliche Organisationsformen auf: (a) Sehr lange repetitive DNA Sequenzen (bis zu einigen 1000 BP) sind eingestreut in Einzelkopie DNA Bereiche (siehe die Übersicht von Singer, 1982). (b) Viele gleichartige repetitive Sequenzen werden hintereinandergeschaltet (eine Übersicht gibt Brutlag, 1980). (c) Repetitive Sequenzen sind in andere repetitive DNA eingestreut (Graham & Schanke, 1980). (d) Lange Strecken von Einzelkopie Sequenzen sind nicht durch repetitive DNA unterbrochen (Wyman & White, 1980). Das "Xenopus Muster" ist nicht bei allen Spezies beobachtet worden. In Drosophila dominiert ein Muster, das auf der Trennung von durchschnittlich 5000 BP langen repetitiven Elementen durch bis zu 35000 BP langen Einzelkopie DNA Abschnitten beruht (Manning et al., 1975; Finnegan et al., 1978). In Hühnern wechseln sich vornehmlich etwa 2000 BP lange repetitive Elemente mit im Durchschnitt 4500 BP langen Einzelkopie DNA Bereichen ab (Eden et al.,

1978).

Obwohl die repetitive DNA in vielen Laboratorien sehr eingehend untersucht wurde, konnte ihr bislang keine eindeutige Funktion zugeordnet werden (siehe die Übersichten von John und Knöchel, 1983; Jelinek und Schmid, 1982; Schmid und Jelinek, 1982). Daher wurden die eher provokativen Vermutungen geäußert, daß repetitive DNA als "um ihrer selbst willen existent" ist und es ihre alleinige Funktion ist, im Genom zu überleben (Doolittle & Sapienza, 1980; Orgel & Crick, 1980). Die bisherige Forschung erbrachte jedoch in einzelnen Fällen interessante Hinweise auf eine Beteiligung repetitiver DNA an verschiedenen Funktionsabläufen. Die Satelliten DNA soll bei der Ausbildung der Chromatinstruktur eine wichtige Rolle spielen (siehe die Übersicht von Igo - Kemenes et al., 1982). Von der dispersen repetitiven DNA wird vermutet, daß einige Elemente a) mobile oder transponierbare Elemente darstellen (Bell et al., 1980; Shapiro, 1979; Starlinger & Saedler, 1976), b) an der Replikation beteiligt sind (Jelinek et al., 1980; Chambers et al., 1982), c) am Prozessieren von mRNA Vorläufern beteiligt sein könnten (Krayev et al., 1980; Lerner et al., 1980) und d) Anteil an der Regulation der Genexpression haben (Davidson & Britten, 1973; Ryskov et al., 1973; Jelinek et al., 1974; Jelinek et al., 1978; Britten & Davidson, 1969, 1979). Dabei wurden bezüglich der Transkription repetitiver DNA folgende Beobachtungen gemacht: Es entstehen RNA Spezies, in denen repetitive Anteile mit Einzel-

kopie Bereichen wechseln (Jelinek et al., 1978; Smith et al., 1974; Constantini et al., 1978). Die Präsenz beider komplementärer Stränge bestimmter repetitiver Elemente innerhalb der Kern RNA Population ermöglicht die Ausbildung intermolekularer RNA - RNA Duplexe (Federoff et al., 1977; Constantini et al., 1980). Ferner wurde nachgewiesen, daß die Konzentration spezifischer repetitiver Transkripte in der Kern RNA verschiedener somatischer Zelltypen um mehr als den Faktor 100 variiert (Scheller et al., 1978). Außerdem ist bekannt, daß sich die Sequenzen polysomaler mRNA Populationen verschiedener Zelltypen stark unterscheiden, während sie in den Kern RNA Populationen fast gleichermaßen vertreten sind (Wold et al., 1978). Alle genannten Punkte führten zu einem Modell der Regulation der Genexpression (Britten und Davidson, 1979). Demzufolge kontrolliert die Formation von RNA - RNA Duplexen zwischen komplementären Transkripten repetitiver DNA die Produktion der mRNA. Eines der beiden basengepaarten repetitiven Elementes ist dabei integraler Bestandteil des mRNA Vorläufers, während das andere ein regulatorisches Element ist. Nicht basengepaarte RNA Spezies unterliegen sehr raschen Degradationsprozessen im Zellkern. Dagegen sollen RNA Spezies mit Duplexregionen stabil sein, ein geeignetes Substrat für den Prozessierungsapparat darstellen und infolgedessen zu cytoplasmatische mRNAs reifen.

Befunde, daß verschiedene repetitive DNA Elemente stadienspezifisch während der Differenzierung transkribiert werden

(Scheller et al., 1978; Kimmel & Firtel, 1979; Zuker & Lodish, 1981; Shepard & Flickinger, 1982; Green & Flickinger, 1970; Carpenter et al., 1982), gaben Anlaß zu Vermutungen hinsichtlich des Einflusses repetitiver Elemente auf Kontrollprozesse während der Embryonalentwicklung (Davidson & Posakony, 1982).

Bei dem südafrikanischen Krallenfrosch, Xenopus laevis, einem von vielen Embryologen benutzten Untersuchungsobjekt, stand die Analyse der Transkription während der Oogenese und der Embryogenese im Vordergrund. Die Transkripte der sich tandemartig wiederholenden Gene, wie z.B. die ribosomalen RNAs, die 5S RNAs und die tRNAs sind gut charakterisiert (siehe Reeder, 1980). Weniger ist dagegen über die Transkription eingestreuter repetitiver DNA bekannt. Die Existenz polyadenylierter RNA Spezies, in der repetitive Bereiche mit Einzelkopieregionen wechseln, ist in Xenopus Oozyten nachgewiesen worden. Diese Transkripte werden in großem Ausmaß an den Lampenbürstenchromosomen während der Oogenese synthetisiert. Sie akkumulieren im Oozytencytoplasma und stellen nach der Befruchtung dem Embryo, der zunächst keine eigene Transkription aufweist, den benötigten Satz materner RNA Sequenzen zur Verfügung (Anderson et al., 1982). Die Ergebnisse von cDNA/RNA Hybridisierungen und zellfreier Translation legen nahe, daß das Entfernen der repetitiven Anteile Voraussetzung für die Verfügbarkeit des Transkriptes zur Proteinbiosynthese ist (Meyerhof et al., 1982). Diese Vermutung wird durch die Anwesenheit von Stop-Codons in den repetitiven Bereichen erhärtet (Posakony et al.,

1981, 1983). Ein Großteil der so strukturierten maternen, polyadenylierten Sequenzen scheint nicht translatierbar zu sein (Richter et al., 1984). Dennoch wurden repetitive Elemente als Bestandteil cytoplasmatischer RNA Spezies beschrieben (Dina et al., 1973; Dina et al., 1974). Auch bei der Charakterisierung klonierter repetitiver DNA wurden Sequenzen gefunden, deren polyadenylierte Transkripte im Cytoplasma auftreten (Kay & Dawid, 1983; Spohr et al., 1981; Spohr et al., 1982) und die daher potentielle mRNAs darstellen.

Aus der vorhergehenden Darstellung wird ersichtlich, daß kein einheitliches Bild über die Bedeutung repetitiver DNA besteht. Vielmehr gibt es eine verwirrende Vielfalt von Einzelbefunden, die zu den genannten gegensätzlichen Standpunkten führten. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte durch die Analyse verschiedener Klassen repetitiver DNA versucht werden, zur Lösung der Fragen nach der Organisation und der Funktion dieser DNA in Xenopus laevis beizutragen. Um der sehr weit gefaßten Fragestellung möglichst umfassend nachgehen zu können, wurden zwei Wege beschritten, repetitive Elemente zu isolieren. Der erste Weg, der a priori zur Isolierung transkribierter repetitiver DNA Elemente führen sollte, war die Analyse einer cDNA Klonbank mit ^{32}p markierter Genom DNA. Der zweite Weg sollte zur Isolierung regelmäßig organisierter repetitiver Elemente führen. Dabei wurde Nutzen aus der Beobachtung gezogen, daß nach Restriktionsabbau und elektrophoretischer Trennung von Genom DNA neben dem üblichen

Schmier von Fragmenten distinkte Banden aufgelagert sind. Beide Wege führten zur Isolierung von insgesamt 13 verschiedenartigen repetitiven Sequenzen, die im Nachfolgenden beschrieben werden. Die Genomorganisation wurde mit der "Southern" Analyse und in - situ Hybridisierung mitotischer Chromosomen untersucht. Die quantitative Auswertung von "dot blots" führte zur Abschätzung der Häufigkeit der isolierten repetitiven Elemente. Zur Analyse der internen Struktur einiger DNA Elemente wurde die Nucleotidsequenz bestimmt. Ein besonderes Interesse galt der Frage nach der Transkription, die durch "Northern blot" Analyse und durch Injektion klonierter Elemente in Xenopus Oozyten untersucht wurde.

2. Experimentelles

2.1 Chemikalien und Materialien

Es wurden Chemikalien folgender Firmen verwendet:

E. coli DNA Polymerase (Fragment nach Klenow), Restriktionsendonucleasen Eco RI, Pst I, Bam HI, Hind III, RNAse A, dATP, dCTP, dGTP, dTTP, ATP, Actinomycin D, Tetracyclin, oligo(dT); Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim.

5'-α-^{32}P dNTPs, ^{32}P Cordycepin, 5'-γ-^{32}P ATP, 5'-^{3}H dNTPs, M13 Sequenzierungs-Kit, Nick Translations-Kit; Amersham Buchler GmbH, Braunschweig - Wenden.

CsCl, Ligasen, Kinasen, Transferasen, Agarose; Bethesda Research Laboratories, Inc., Rockville, USA.

Spermin, Polyvinylsulfat, SDS, Triton X-100, Saccharose (RNAse frei), Neomycin, Penicillin, Streptomycin, Ethidiumbromid, Rinderserumalbumin, Bromphenolblau; Serva, Heidelberg.

AMV Reverse Transcriptase wurde freundlicherweise von Dr. J. Beard, St. Petersburg, USA, zur Verfügung gestellt.

Oligo(dT)-Cellulose T3; Collaborative Research, Inc., Waltham, Mass., USA.

Ampicillin, Cacodylsäure, Acrylamid; Sigma GmbH, München, Neubiberg.

λ DNA; Miles Laboratories, Inc., USA.

Ficoll 400, Sephadex G-75, Sephadex LH-60; Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden.

Polyvinylpyrollidon; Fluca Ag, Schweiz.

Bacto Trypton, Bacto Yeast Extract, Bacto Agar; Difco Bio Labs., USA.
Choriongonadotropin; Schering AG, Berlin West.
Nitrocellulosefilter BA 85 und BA 83; Schleicher und Schüll., Dassel.
Alle nicht aufgeführten Chemikalien wiesen den Reinheitsgrad p.A. auf und waren von Merck, Darmstadt.

2.2 Tiere und Gewinnen von Laich (Knöchel & Bladauski, 1980)

Es wurden südafrikanische Krallenfrösche (Xenopus laevis) aus eigener Zucht verwendet. Das Ablaichen wurde durch Injektion von Gonadotropin in den dorsalen Lymphsack und Erhöhen der Wassertemperatur von 18°C auf 25°C induziert. Männliche Tiere erhielten im Abstand von ca. 8 h zwei Injektionen von je 400 Einheiten, weibliche Tiere bekamen einmal 800 Einheiten injiziert. Zur Isolierung unbefruchteter Eier wurden weibliche Tiere in Abwesenheit der Männchen mit 800 Einheiten des Hormons gespritzt. Die Gelege, die sich zum Kaulquappenstadium entwickeln sollten, wurden in Leitungswasser gewaschen, mit Folie abgedeckt und in Gegenwart von Penicillin (50 µg/ml), Neomycin (100 µg/ml) und Streptomycin (50 µg/ml) aufgezogen. Lag das gewünschte Entwicklungsstadium vor dem Schlupf, wurden die Eier 5 min vorsichtig unter sanften Schwenken in 4,5% Cystein/HCl in Holtfreterlösung (59 mM NaCl, 0,67 mM KCl, 0,9 mM $CaCl_2$; Holtfreter, 1931), die mit NaOH auf pH 7,5 ein-

gestellt worden war, von ihren Gallerthüllen befreit. Die Gallerthüllen und die Cysteinlösung wurden durch 10-15 Waschgänge mit je 400 ml Holtfreterlösung entfernt. Unbefruchtete Eier wurden sofort aufgearbeitet, befruchtete Eier konnten sich in Holtfreterlösung zum gewünschten Stadium entwickeln.

2.3 RNA Isolierung

2.3.1 Isolierung der Zellkerne

Die Froschembryonen wurden fünfmal im 10fachen Volumen Homogenisierpuffer (0,25 M Saccharose, 0,1 M KCl, 0,01 M $MgCl_2$, 0,003 M $CaCl_2$, 0,01 M Tris/HCl (pH 7,5), 10 µg/ml Polyvinylsulfat (Perlman & Rosbash, 1978)) gewaschen und im fünffachen Volumen Homogenisierpuffer mit sieben Strokes eines locker eingepaßten Dounce Homogenisators und zusätzlich mit vier Strokes eines fest eingepaßten Dounce Homogenisators (nur Kaulquappen) homogenisiert. Das Homogenat wurde 10 min, 2°C, 600 g zentrifugiert, um die Zellkerne zu sedimentieren. Das Sediment wurde im 20fachen Volumen Homogenisierpuffer, der 1% Zitronensäure enthielt, suspendiert, damit sich die Dotterplättchen auflösen (Holoubek & Tiedemann, 1978). Es wurde erneut zentrifugiert (10 min, 2°C, 600 g). Das Suspendieren in Homogenisierpuffer, 1% Zitronensäure und die anschließende 600 g Zentrifugation wurden drei- bis siebenmal wiederholt, bis der Überstand klar blieb und kein Dotter mehr im Sediment zu erkennen war.

2.3.2 Extraktion der Kern RNA (Knöchel & Bladauski, 1980)

Die sedimentierten Zellkerne wurden im 15fachen Volumen Extraktionspuffer (50 mM $NaCH_3COO$, 1 mM EDTA, 1% SDS, mit Essigsäure auf pH 5,1 eingestellt; Warner et al., 1966) suspendiert und mit dem gleichen Volumen mit Extraktionspuffer gesättigtem Phenol 10 min bei Raumtemperatur unter mäßigem Rühren extrahiert. Die Phasen wurden durch Zentrifugation für 10 min bei 10000 g und 15°C getrennt. Die wässrige Phase wurde abgehoben, und die Phenolphase mit einem halben Volumen Extraktionspuffer 5 min bei 65°C nachextrahiert. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden so lange mit an Extraktionspuffer gesättigtem Phenol nachextrahiert, bis nach der Phasentrennung keine Mittelschicht mehr vorhanden war. Nach Zugabe von 1/10 Volumen 30% NaCl und zwei Volumen Ethanol (96%) wurden die Nucleinsäuren bei -30°C über Nacht präzipitiert.

2.3.3 Isolierung der Polysomen (Knöchel & Bladauski, 1980)

Der 600 g Überstand der ersten Zentrifugation (siehe Kap. 2.3.1) wurde auf eine Triton X-100 Konzentration von 0,5% eingestellt und, um Mitochondrien zu entfernen, 10 min bei 100000 g und 2°C zentrifugiert. Die Polysomen wurden aus dem postmitochondralen Überstand 90 min durch ein 1 ml Kissen von 0,8 M Saccharose in Homogenisierpuffer sedimentiert.

2.3.4 Extraktion polysomaler RNA (Aviv & Leder, 1972)

Die Polysomen wurden in 0,1 M Tris/HCl (pH 9,0), 0,1 M NaCl, 1 mM EDTA, 1% SDS gelöst (20 A_{260}/ml) und bei Raumtemperatur mehrere Male mit gleichen Volumina Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (50/50/1) extrahiert, bis nach der Phasentrennung keine Mittelschicht mehr vorhanden war. Die polysomale RNA wurde durch 1/10 Volumen 30% NaCl und 2 Volumen 96% Ethanol bei -30°C über Nacht ausgefällt.

2.3.5 Isolierung polyadenylierter RNA Sequenzen

Die präparierte RNA wurde in 0,5 M NaCl, 0,01 M Tris/HCl (pH 7,5), 0,2% SDS, 1 mM EDTA gelöst (0,5-1 mg/ml) und auf eine mit dem gleichen Puffer äquilibrierte oligo(dT)-Cellulosesäule (1 ml) (Aviv & Leder, 1972) aufgetragen. Nach Spülen mit dem gleichen Puffer wurde die an die Säule gebundene polyadenylierte RNA mit 0,01% SDS eluiert. Zur weiteren Reinigung wurden die Eluate in gleicher Weise nochmals über die Säule gegeben. Das Volumen des Eluates wurde anschließend eingeengt und die RNA präzipitiert.

2.3.6 Isolierung gesamter, zellulärer RNA

Xenopus laevis Embryonen und unbefruchtete Eier wurden manuell sortiert. Je 10 Embryonen der gewünschten Entwicklungsstadien wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und sofort

in 0,5 ml 10 mM Tris/HCl (pH 7,5), 1,5 mM $MgCl_2$, 10 mM NaCl, 1 mg/ml Proteinase K, 1 mM EDTA homogenisiert. Nach schnellstmöglicher Zugabe von 2% SDS wurde 30 min bei Raumtemperatur inkubiert (Probst et al., 1979). Der pH Wert wurde durch 4,5 ml 50 mM Na-acetat (pH 5,1), 1 mM EDTA, 2% SDS herabgesetzt. Die RNA wurde durch mehrere Extraktionen mit Phenol/Chloroform (50/50) gereinigt und nach Zusatz von 0,3 M Na-acetat mit 15 ml Ethanol ausgefällt. Pelletierte Nucleinsäuren wurden in 50 mM Tris/HCl (pH 8,0), 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 M CsCl durch ein 2 ml Kissen 5,7 M CsCl in dem gleichen Puffer zentrifugiert (18 h, 32000 rpm, 4°C, SW 41, Beckman), um die RNA von DNA Resten zu trennen. Das RNA Pellet wurde in 0,3 ml 1% SDS, 1% ß- Mercaptoethanol, 10 mM Tris/HCl (pH 7,4), 1 mM EDTA gelöst. Durch zwei Fällungen mit Ethanol wurde die RNA von SDS und ß- Mercaptoethanol gereinigt. Sämtliche Arbeitsschritte bei der Isolierung von RNA wurden steril ausgeführt.

2.4 Isolierung von DNA

2.4.1 Isolierung von Xenopus DNA aus Leber

Die Isolierung von DNA aus Leber erfolgte nach der Methode von Blin und Stafford (1976). Ein erwachsener weiblicher Frosch wurde in MS 222 (4 g/l) betäubt und anschließend dekapitiert. Die Leber wurde entnommen, auf Eis kleingeschnitten und sofort in Flüssigem Stickstoff eingefroren. Das Ge-

webe wurde in einem zur Hälfte mit flüssigem Stickstoff gefüllten "waring blendor" pulverisiert. Das Gewebepulver wurde in auf 50°C vorgewärmte 0,5 M EDTA (pH 8,0), 0,5% SDS, 100 µg/ml Proteinase K gegeben und unter leichtem Schwenken in einem "Brunswick gyratory waterbath" 2 h inkubiert. Es folgten drei Extraktionen mit Phenol/m-Kresol (7,5/1; gesättigt mit Tris/HCl (pH 8,0), 0,1% 8-Hydroxychinolin). Die wässrige Phase wurde anschließend solange gegen 50 mM Tris/HCl (pH 8,1), 10 mM NaCl, 10 mM EDTA dialysiert bis der Dialysepuffer $A_{270\ nm}$ 0,05 aufwies. Vorerhitzte RNAse A (15 min, 70°C) wurde zugesetzt (Endkonzentration 100 µg/ml) und 2 h bei 37°C inkubiert. Durch drei Extraktionen mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (50/50/1) wurde das Enzym entfernt. Danach wurde die wässrige Phase gegen 10 mM Tris/HCl (pH 8,1), 1 mM EDTA dialysiert ($A_{270\ nm}$ des Dialysepuffers 0,05). Durch Zugabe von 0,3 M Na-acetat und 2,5 volumen 96% Ethanol wurde die DNA ausgefällt. Über Nacht präzipitierte DNA wurde sedimentiert, dreimal mit 70% Ethanol gewaschen, in 10 mM Tris/HCl (pH 7,4) gelöst und in Aliquots bei -30°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

2.4.2 Isolierung von M13 RF DNA und Plasmid DNA

Die Isolierung erfolgte nach der Alkali - Extraktionsmethode von Birnboim und Doly (1979) mit anschließender Reinigung in isopyknischen Gradienten. Durch Zentrifugation wurden die auf

Eis abgekühlten Bakterienkulturen pelletiert (5 min, 4°C, 7500 g) und im 1/25 des Kulturvolumens in 50 mM Glukose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris/HCl (pH 8,0) suspendiert. Lysozym wurde zugesetzt, so daß die Endkonzentration 2 mg/ml betrug. Nach 15 min bei Raumtemperatur wurde die Suspension auf Eis abgekühlt und das doppelte Volumen 0,2 n NaOH, 1% SDS sorgfältig untergemischt. Nach einer 5 min Inkubation auf Eis wurde mit 0,5 Volumen 3 M Na-acetat (pH 4,8) neutralisiert. Nach 60 min im Eisbad wurde 1 h bei 12000 g, 0°C zentrifugiert. 80% des Überstandes wurden vorsichtig abgehoben. Durch 37,5% Isopropanol wurden die Nucleinsäuren ausgefällt. Präzipitierte Nucleinsäuren wurden durch Zentrifugation pelletiert (12000 g, 0°C, 30 min) und in 10 mM Tris/HCl (pH 7,4), 1 mM EDTA gelöst (8 ml/500 ml Kulturvolumen). Pro ml Lösung wurde 0,95 g CsCl und 50 ul Ethidiumbromid (10 mg/ml) zugegeben. Die Lösung wurde 48 h im Ti 50 Rotor (Beckman) bei 45000 rpm, 4°C zum Gleichgewicht zentrifugiert. Die unter UV - Licht sichtbare Plasmid- oder RF DNA Bande wurde mit 2 ml Spritzen durch seitliches Punktieren der Zentrifugenröhrchen abgesaugt. Zum Entfernen von Ethidiumbromid folgten 4-6 Isopropanolextraktionen. Nach Dialyse gegen 10 mM Tris/HCl (pH 7,4), 1 mM EDTA wurde die DNA mit Ethanol ausgefällt. Pelletierte DNAs wurden mit 70% Ethanol gewaschen und schließlich in 10 mM Tris/HCl (pH 7,4), 0,1 mM EDTA gelöst. Bei -30°C wurden Plasmid oder RF DNAs zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

2.4.3 Isolierung von M13 Einzelstrang DNA

1 ml der 1,5 ml Kulturen wurden in einer Eppendorf Tischzentrifuge 5 min zentrifugiert (15000 g). 0,8 ml des phagenhaltigen Überstandes wurden vorsichtig abgenommen und mit 0,2 ml 20% Polyethylenglykoll, 2,5 M NaCl versetzt (Yamamoto et al., 1970). Nach 20 min bei Raumtemperatur wurden die Polyethylenglykoll - Phagen - Aggregate abzentrifugiert (5 min, 15000 g) und der Überstand verworfen. Nach erneuter kurzer Zentrifugation (10 sec) wurden Reste des Überstandes mit ausgezogenen Pasteurpipetten entfernt. Das in 10 mM Tris/HCl (pH 7,4), 1 mM EDTA gelöste Pellet wurde einer Phenolextraktion unterzogen (mit Puffer gesättigt). Die Phagen DNA wurde mit 0,3 M Na-acetat, 10 mM Mg-acetat und drei Volumen 96% Ethanol ausgefällt. Sedimentierte DNA wurde zweimal mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen und schließlich in 50 µl 10 mM Tris/HCl (pH 7,4), 0,1 mM EDTA gelöst.

2.5 Restriktionsverdauungen von DNA

Die Ansätze enthielten 50 µg/ml DNA, 2-5 Units Enzym/µg DNA, sowie die vom Hersteller empfohlenen Puffer- und Salzbedingungen. Es wurde 90 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1% SDS und Erhitzen (5 min, 70°C) gestoppt. Die DNA wurde gefällt. In einigen Fällen wurde das Enzym durch Extraktionen mit Phenol/Chloroform (1/1) entfernt. Sedimentierte, Ethanol gewaschene DNA wurde in dem zur folgenden Verwen-

dung benötigten Puffer gelöst.

2.6 Gelelektrophoresen

2.6.1 Agarosegele zur Trennung von DNA

Die Elektrophoresen wurden in horizontalen Slabgelapparaturen durchgeführt. Abhängig von der Größe der zu trennenden Fragmente wurden 0,7%-2% Agarosegele benutzt. Agarose wurde durch Kochen in Elektrophoresepuffer (30 mM Tris, 30 mM NaH_2PO_4 (pH 7,6), 1 mM EDTA (Hayward & Smith, 1972)) in Lösung gebracht. DNA Proben wurden in Elektrophoresepuffer, 0,025% Bromphenolblau, 5% Glyzerin aufgetragen. Nach Ende der Elektrophorese (wenn der Farbstoff adäquate Trennung anzeigte) wurden die Gele 15 min in Ethidiumbromid (1 µg/ml Elektrophoresepuffer) gefärbt, und die DNA unter UV - Licht sichtbar gemacht.

2.6.2 Agarosegele zur Trennung von RNA

Es wurden vertikale Slabgele mit 1,2% Agarose in 10 mM $NaPO_4$ (pH 7,0) verwendet. Die Agarose wurde auf ein Polyacrylamidkissen gegossen. RNA (5 µg/Tasche) wurde in 30 µl 10 mM $NaPO_4$, 50% Dimethylsulfoxid, 1 M Glyoxal (entionisiert durch Bio - Rad AG 501 - X8; McMaster & Carmichel, 1980) gelöst, 5 min bei 50°C erhitzt und umgehend auf das Gel aufgetragen. Während der Elektrophorese (30 mA) wurde der Puffer auf Grund seiner geringen Ionenstärke zwischen den Pufferkammern zirkuliert, um den pH Wert konstant zu halten. Nach der Elektrophorese

(Bromphenolblau war zwischen 4 und 6 cm weit gelaufen) wurde das Gel im Dunkeln 20 min in 10 mM $NaPO_4$, 30 µg/ml Acridinorange gefärbt. Überschüssiger Farbstoff wurde anschließend ebenfalls im Dunkeln viermal 20 min in Elektrophoresepuffer entfernt. Die RNA wurde durch Bestrahlung mit kurzwelligem UV - Licht sichtbar gemacht.

2.6.3 Formaldehyd - Agarosegele

Das Protokoll von Derman et al. (1981) wurde befolgt. RNA Pellets wurden zu einer Konzentration von 0,5 mg/ml in 50% Formamid, 6% Formaldehyd, 0,02 M Borat (pH 8,3), 10% Glyzerin, 0,2 mM EDTA gelöst. Zur völligen Denaturierung der DNA wurde 2 min bei 65°C erhitzt (Rave et al., 1979). Die RNA Proben wurden mit 0,001% Bromphenolblau versetzt und sofort aufgetragen. Horizontale 1-1,25% Agarose Slabgele, die in Elektrodenpuffer (0,02 M Borat (pH 8,3), 0,2 mM EDTA, 3% Formaldehyd) gegossen wurden, liefen 4-5 h bei 200 V. Anschließend wurden die Gele mit Acridin Orange gefärbt und dem Transfer unterzogen (siehe Kap. 2.7.1).

2.6.4 Nichtdenaturierende Polyacrylamidgele

Nichtdenaturierende Polyamidgele wurden in vertikalen Slabgelapparaturen hergestellt. 5% oder 6% Acrylamidlösung (Acrylamid/Methylenbisacrylamid (30/1)) in 50 mM Tris/Borat (pH 8,3), 1 mM EDTA wurde durch 1 ml 10% Ammoniumpersulfat und 40 µl TEMED pro 100 ml Gellösung polymerisiert. Die Vorelektro-

phorese wurde unter Wasserkühlung 1 h bei 25 mA durchgeführt. Die DNA Proben (gelöst in Elektrophoresepuffer) wurden aufgetragen und die Elektrophorese unter gleichen Bedingungen durchgeführt. Mit Ethidiumbromid gefärbte DNA wurde unter UV - Licht sichtbar gemacht.

2.6.5 Strangtrennungsgele

Es wurden 5% Polyacryamidgele (Acrylamid/Methylenbisacrylamid (50/1)) in 50 mM Tris/Borat (pH 8,3), 1 mM EDTA verwendet. Restriktionsfragmente (1 µg) wurden in 40 µl 30% (v/v) Dimethylsulfoxid, 1 mM EDTA 0,05% Xylencyanol, 0,05% Bromphenolblau gelöst, 2 min bei 90°C erhitzt, schnell in Eiswasser abgekühlt und sofort aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 20 mA durchgeführt; dadurch wurde eine störende Erwärmung des Gels vermieden (Maxam & Gilbert, 1980). Die Elektrophorese wurde beendet, wenn die Farbstoffe die gewünschte Strecke zurückgelegt hatten.

2.6.6 Sequenzgele

Es wurden dünne Sequenzgele (Sanger et al., 1977) der Größen 400 x 400 x 0,8 mm, 850 x 200 x 0,8 mm, 500 x 400 x 0,6 mm und 1000 x 400 x 0,6 mm benutzt. 5%-10% Polyacrylamid (1:20) in 8,3 M Harnstoff, 100 mM Tris/Borat (pH 8,3 für nach Maxam und Gilbert, 1980, pH 8,8 für mit der Dideoxy - Kettenabbruch-

methode (Sanger et al., 1978) sequenzierte DNA), 2 mM EDTA wurde entgast, mit 1 ml 10% Amoniumpersulfat und 20 µl TEMED pro 100 ml Gellösung versetzt und zwischen die installierten Glasplatten gegossen. Die Vorelektrophorese (40 W für 400 x 400 x 0,8 mm Gele, 75 W für 1000 x 400 x 0,6 mm Gele, 55 W für 850 x 200 x 0,8 mm Gele, 70 W für 500 x 400 x 0,6 mm Gele) lief bei konstanter Leistung wenigstens 2 h. Die Proben wurden aufgetragen und die Elektrophorese für die gewünschte Zeit durchgeführt.

2.7 Isolierung von Nucleinsäuren aus Gelen

2.7.1 Elution von Nucleinsäuren aus Polyacrylamidgelen

Die Vorschrift von Maxam und Gilbert (1980) wurde - mit einigen Veränderungen - befolgt. Der die gewünschte Nucleinsäure enthaltende Gelbereich (identifiziert durch Ethidiumbromidfärbung oder durch Autoradiographie) wird möglichst eng ausgeschnitten. Das mit einem Glasstab fein zerquetschte Gel wird bei 37°C in 0,3 ml 0,5 M Ammoniumacetat, 10 mM Mg-acetat, 1 mM EDTA, 0,1% SDS 6-12 h geschüttelt. Es wird 15 min bei 15000 g zentrifugiert (Raumtemperatur). Der Überstand wird abgehoben und durch Glaswolle filtriert. Das Sediment wird mit 0,2 ml der gleichen Lösung versetzt. Nach ausgiebigem Vortexen wird erneut zentrifugiert. Nucleinsäuren werden mit 1 ml 96% Ethanol ausgefällt. Sedimentierte Nucleinsäuren (5 min, 15000 g) werden in 100 µl 10 mM Tris/HCl (pH 7,4), 1 mM

EDTA gelöst. Zur weiteren Reinigung wird ein sogenannter Kleinschrittausschluß durchgeführt. Dazu füllt man 1 ml Sephadex LH-60, äquilibiert in dem gleichen Puffer, in eine mit Quarzwolle verschlossene 1 ml Eppendorf Pipettenspitze und entfernt den Puffer durch Zentrifugation für 2,5 min bei 1000 rpm in einer Christ Kühlzentrifuge. Die Probe wird aufgetragen. Das durch eine 3 min Zentrifugation erhaltene Eluat wird mit Ethanol gefällt. Sedimentierte Nucleinsäuren wurden dreimal mit 70% Ethanol gewaschen. Trockene Pellets wurden bis zur weiteren Verwendung bei -30°C aufbewahrt.

2.7.2 Elution von DNA aus Agarosegelen

Es wurden 1% Agarosegele in 40 mM Tris/Acetat (pH 8,2), 1 mM EDTA, 1 µ/ml Ethidiumbromid in waagerechten Slabgelapparaturen verwendet. Die DNA Proben wurden im gleichen Puffer, dem 5% Glyzerin, 0,1% Bromphenolblau zugesetzt war, aufgetragen und die Elektrophorese wurde bei 25 mA durchgeführt. Die Trennung der Fragmente wurde unter UV - Licht beobachtet. Nach optimaler Trennung der Fragmente wurde die Elektrophorese unterbrochen. Gelstücke - etwas größer als die Fragmentbanden - wurden ausgeschnitten (in Laufrichtung hinter den Fragmenten). Die Ausschnitte wurden mit "low melting temperature agarose" im gleichen Puffer aufgefüllt. Nach Gelieren wurde die Elektrophorese fortgesetzt bis die DNA Fragmente in die "low melting point agarose" eingewandert waren. Die Gelstücke wurden

eng ausgeschnitten und mit 0,1 Volumen 5 M NaCl versetzt. Nach 20 min bei 4°C wurde die Agarose bei 68°C aufgeschmolzen. Die auf 30°C abgekühlte Lösung wurde zweimal mit Phenol (gesättigt mit 1oo mM Tris/HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA, 0,5 M NaCl) extrahiert. Nach einer Chloroformextraktion wurde die DNA durch Zugabe von 10 mM Mg-acetat und drei Volumen 96% Ethanol ausgefällt. Präzipitierte, salzfreie, trockene DNA Pellets wurden bei -3o°C zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

2.8 Immobilisierung von Nucleinsäuren an Nitrocellulose

2.8.1"Southern - Transfer" (southern, 1975)

Zur Denaturierung wurden DNA Gele vor dem Transfer 30 min in 500 ml 0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl inkubiert. Neutralisiert wurde 30 min in 1 M Tris/HCl (pH 8,0), 1,5 M NaCl. RNA Gele wurden direkt dem Transfer unterzogen. Eine flache Schüssel wurde etwa o,5 cm hoch mit 20 X SSC gefüllt. Drei gestapelte Glasplatten (0,3 cm stark) wurden als feste Unterlage hineingelegt. Darüber wurden zwei Lagen mit 20 X SSC befeuchtetes Whatman 3MM Filterpapier so gelegt, daß die überstehenden Filterpapierenden in den Puffer eintauchten. Hierauf wurde das Gel gelegt. Darauf wurde ein deckungsgleich zugeschnittener Nitrocellulosefilter (mit H_2O befeuchtet, dann in 20 X SSC äquilibriert), darauf zwei ebenfalls deckungsgleiche, mit 20 X SSC befeuchtete 3MM Papiere plaziert. Alle diese Lagen

wurden sorfältig, luftblasenfrei übereinander geschichtet. Hierauf kam ein 20 cm Stapel saugfähiges Handtuchpapier. Durch dieses "Saugreservoir" wurden die Nucleinsäuren im Pufferstrom nach oben gesaugt. Der Transfer wurde etwa 16 h aufrechterhalten. Anschließend wurden die Nucleinsäuren durch 2 h im Vakuumofen bei 80°C am Filter immobilisiert.

2.8.2 "dot blots"

DNA Proben (zwischen 0,5 µg/ml und 1 mg/ml) wurden Alkali-denaturiert und anschließend neutralisiert. Nach Zugabe von 2 X SSC wurden maximal 10 µl als "dot" auf einen unbehandelten Nitrocellulosefilter aufgetragen, der dann zur Immobilisierung der DNA für 2 h bei 80°C im Vakuumofen getrocknet wurde.

2.8.3 Immobilisierung von DNA aus Bakterienkolonien

Das Protokoll von Grunstein und Hogness (1975) wurde befolgt. Bakterienklone wurden auf auf Agarplatten gelegte Nitrocellulosefilter bis zu einem Durchmesser von 3-4 mm angezogen. Mit der Kolonietragenden Seite nach oben wurden die Filter 5 min auf mit o,5 M NaOH befeuchtetes Filtrierpapier, zweimal auf mit 0,5 M Tris/HCl (pH 7,4) und schließlich auf ein mit 2 X SSC befeuchtetes Filtrierpapier gelegt. Die Filter wurden dann mit 0,5 mg/ml Proteinase K (in 1 mM EDTA, 2 X SSC, o,5% SDS) für 3o min bei 37°C inkubiert. Nach Waschung der Filter in 2

X SSC wurde die DNA im Vakuumofen 2 h bei 80°C immobilisiert.

2.9 Elektrotransfer von DNA aus Acrylamidgelen auf DBM Papier

Die von Bittner et al.(1980) angegebene Methode wurde befolgt. Nach Ende der Elektrophorese, Ethidiumbromidfärbung und Photographie wurden Polyacrylamidgele zur Denaturierung der DNA 20 min bei Raumtemperatur in 500 ml 0,2 M NaOH, 0,6 M NaCl bewegt. Daraufhin wurde gründlich mit destilliertem Wasser gewaschen. Es folgten drei 20 min Waschgänge mit je 500 ml 25 mM $NaPO_4$ (pH 6,5) zum Äquilibrieren. ABM Papier wurde gemäß dem Protokoll von Alwine et al. (1977) in die DBM Form überführt. ABM Papier (ca. 1oo cm^2) wurde in 120 ml eiskalte 1,2 n HCl und 3,4 ml $NaNO_3$ (10 mg/ml) gelegt. Nach einer Reaktionszeit von 30 min wurde (direkt vor dem Transfer) zweimal mit H_2O (1 min, 0°C) und zweimal 1 min mit 100 mM Na-acetat (pH 4,0) gewaschen. Es folgte eine weitere Waschung mit 25 mM $NaPO_4$ (pH 6,5). Auf das DBM Papier wurde das Gel gelegt, dann beides zwischen mit Puffer gesättigtem Whatman 3MM Papier. Diese Anordnung wurde schließlich zwischen die Transfermembranen gelegt und in die Transferkasette geklemmt, die dann gemäß dem elektrischen Feld in dem Elektrotransferapparat (Hoefer Scientific Instruments) installiert wurde. Der Transfer fand für 20 h unter Pufferzirkulation und Wasserkühlung statt. Nach dem Transfer wurden restliche Diazo-

niumgruppen durch einen 30 min Waschgang in 0,5 n NaOH zerstört. Durch ausgiebiges Waschen in 2 X SSC, 0,1% SDS wurde neutralisiert.

2.10 Markierung von DNA

2.10.1 Nicktranslation

Es wurde ein käufliches System verwendet (Amersham Buchler) und gemäß den Anweisungen des Herstellers verfahren. Salzfreie, trockene DNA Pellets wurden in 10 mM Tris/HCl (pH 7,4), 0,1 mM EDTA gelöst (0,1 µg/10 µl). Die Ansätze enthielten 4 µl α-^{32}P-dCTP (800-2000 Ci/mmol), 4 µl Nucleotidpuffer (enthält Tris/HCl (pH 7,8), $MgCl_2$, je 100 µM dATP, dGTP, dTTP), 10 µl DNA, 2 µl Enzymlösung (1 U DNA Polymerase I, 20 pg DNAse I). Inkubiert wurde 90 min bei 13°C. Die Reaktion wurde durch 80µl 1% SDS gestoppt. Nicht eingebautes Material wurde durch einen "Kleinschrittausschluß" entfernt (siehe Kap.2.7.1).

2.10.2 Synthese ^{32}P markierter cDNA (Knöchel & Bladauski, 1981)

Ein 125 µl Ansatz enthielt: 50 mM Tris/HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 6 mM $MgCl_2$, 10 mM Dithiothreitol, je 0,5 mM dATP, dGTP, dTTP, 0,1 mCi ^{32}P-dCTP (800 ci/mmol), 50 µg/ml Actinomycin D, 100 µg/ml oligo$(dT)_{12-18}$, 5 µg polyadenylierte RNA und 15 U Reverse Transcriptase. Nach Inkubation für 90 min bei 43°C

wurde die Reaktion mit 20 µl 10% SDS gestoppt. Die RNA wurde mit 100 µl 1 M NaOH für 3 h bei 60°C hydrolisiert. Der Ansatz wurde mit 1oo µl 1 M HCl neutralisiert. Nicht eingebautes Material wurde durch Chromatographie auf Sephadex G-75 entfernt.

2.10.3 3' Endmarkierung mit Klenow - Polymerase

Zurückstehende 3' Enden wurden durch Klenow - Polymerase aufgefüllt. DNA Restriktionsfragmente (ca. 0,1-1 µg) wurden in 10 µl 20 mM Tris/HCl (pH 8,0), 20 mM $MgCl_2$ gelöst. 10 µl des jeweilig benötigten α-^{32}P- dNTP wurden zugegeben (800-2000 Ci/mmol, 10 µCi/µl). Durch 1 U Enzym wurde die Reaktion gestartet. Nach 15 min bei Raumtemperatur wurden 0,5 mM nichtradioaktives dNTP zugegeben und weitere 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. 1% SDS stoppte die Reaktion. Nach "Kleinschrittausschluß" und Ethanol-Fällung standen die markierten Fragmente zur weiteren Verfügung.

2.10.4 5' Endmarkierung mit T_4 - Polynucleotid - Kinase

Dephosphorylierte DNA (siehe Kap. "Klonierung in M13 Phagen") (ca. 20 pmol 5' Enden)wurde in 50 µl Tris/HCl (pH 7,6), 10 mM $MgCl_2$, 5 mM Dithiothreitol, sowie 50 µl γ-^{32}P-ATP (2000-7000 Ci/mmol) gelöst. Die Reaktion wurde mit 36 U Kinase gestartet und 30 min bei 37°C inkubiert. Durch 1% SDS wurde die Mar-

kierung beendet. Nicht eingebautes Material wurde durch "Kleinschrittausschluß" entfernt. Mit Ethanol gefällte, entsalzte DNA wurde - falls erforderlich - bei -80°C aufbewahrt.

2.10.5 3' Endmarkierung mit Terminaler Transferase

Die DNA Fragmente (ca. 20 pmol 3' Enden) wurden in 35 µl H_2O gelöst. Es wurden 10 µl ^{32}P Cordycepin und 5 µl Puffer (1,4 M Cacodylsäure, 0,3 M Tris (pH 7,6 mit KOH), 1 mM Dithiothreitol, 1 mM $CoCl_2$) zugesetzt, 2 min bei 37°C vorinkubiert und dann die Reaktion mit 15 U/20 pmol Enden Terminaler Desoxynucleotidyltransferase gestartet. Nach 30 min bei 37°C wurde die Reaktion mit 10 mM EDTA (pH 8,0) und durch Erhitzen (10 min, 70°C) gestoppt. Nach Extraktion mit $CHCl_3$/Isoamylalkohol (24/1) wurde nicht inkorporiertes Material durch einen "Kleinschrittausschluß" entfernt. Durch Präzipitation und Waschen mit Ethanol wurde die markierte DNA gereinigt.

2.11 Hybridisierungen

"Southern blots" und Koloniefilter wurden in Plastikbeuteln mit (ca. 100 µl/cm^2) 10 X Denhardt - Lösung (0,2% Rinderserumalbumin, 0,2% Ficoll, 0,2% Polyvinylpyrollidon; Denhardt, 1966), 4 X SSC, 1 mM EDTA (pH 8,0), 0,5% SDS, 100 µg/ml sonicierter, denaturierter Bakterien DNA bei 65°C wenigstens 4 h inkubiert. Die Lösung wurde dann durch 1 X 10^5 - 1 X 10^6

dpm/ml Probe in gleicher Lösung ersetzt (doppelsträngige DNA war zuvor Alkali - denaturiert worden). Die Hybridisierung erfolgte über einen Zeitraum von 12 h bis 72 h. Anschließend wurden die Filter 3 X je 30 min in 2,0 X SSC bei Raumtemperatur (ca. 2 ml/cm^2) und 3 X jeweils 30 min in 0,2 X SSC bei Raumtemperatur gewaschen. Unter diesen Bedingungen sind Kreuzhybridisierungen von DNA Fragmenten mit ca. 20% Divergenz möglich. War eine höhere Stringenz erforderlich, erfolgte ein weiterer Waschgang in 0,2 X SSC bei 50°C (10%-12% Divergenz), oder bei 65°C in 0,1 X SSC (keine Divergenz mehr erlaubt). Die Filter wurden abgetropft und in Klarsichtfolie gewickelt. Röntgenfilme (Kodak XAR 5; DuPont Cronex 4) wurden mit den Filtern unter Verwendung von Verstärkerfolien (DuPont Lightning Plus) bei -80°C zwischen 2 h und 10 Tagen exponiert.

RNA "blots" wurden in 50% Formamid, 5 X Denhardt - Lösung, 4 X SSC, 1 mM EDTA, 0,5% SDS, 100 µg/ml denaturierte, sonicierte Bakterien DNA bei 42°C präinkubiert und mit 1 X 10^5 - 1 X 10^6 dpm Probe/ml hybridisiert. Die übrigen Arbeitsschritte waren identisch mit denen der DNA "blots".

2.12 DNA Sequenzierung nach Maxam und Gilbert (1980)

Die nur an einem Ende markierten DNA Fragmente wurden in H_2O gelöst und mit "carrier" DNA (o,1 mg/ ml) versetzt. Zur Spaltung der Guaninreste wurden 5 µl DNA in 200 µl 50 mM Na-cacodylat (pH 8,0), 1 mM EDTA gegeben, in Eis auf 0°C abge-

kühlt und mit 1 µl Dimethylsulfat versetzt. Es wurde 5 min bei 20°C inkubiert, danach sofort auf Eis abgekühlt und 50 µl 1,5 M Na-acetat (pH 7,0), 1 M ß-Mercaptoethanol, 100 µg/ml tRNA (0°C) und 750 µl 96% Ethanol (-30°C) zugesetzt. Nach 5 min bei -80°C wurde die DNA sedimentiert, in 250 µl 0,3 M Na-acetat gelöst und erneut mit 750 µl 96% Ethanol gefällt.

Zur Spaltung der Pyrimidine wurden 10 µl DNA mit 10 µl H_2O versetzt. Zur Spaltung der Cytosine wurden 5 µl DNA mit 15 µl 5 M NaCl versetzt. Beide Lösungen wurden auf 0°C abgekühlt und 30 µl Hydrazin (95%) wurden zugesetzt. Nach 5 min bei 20°C wurde erneut auf 0°C abgekühlt. Durch Zugabe von 0,3 M Na-acetat, 0,1 mM EDTA, 25 µg/ml tRNA (0°C) und 750 µl 96% Ethanol (-30°C) wurden die Fragmente 5 min bei -80°C ausgefällt. Sedimentierte DNA wurde in 250 µl 0,3 M Na-acetat gelöst und erneut mit Ethanol ausgefällt. Nun wurden die Fragmente der G-, C- und Pyrimidinreaktion sedimentiert, 3 X mit je 1 ml 70% Ethanol gewaschen und getrocknet.

Zur Spaltung der Purine wurde zu 10 µl DNA 10 µl H_2O und 2 µl 4% (v/v) Ameisensäure (pH 2,0 mit Piperidin) gegeben. Nach 40 min bei 20°C wurde der Ansatz in flüssigem Stickstoff eingefroren und lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde in 20 µl H_2O aufgenommen und erneut lyophilisiert.

Zur Spaltung der Zucker - Phosphat - Kette wurden die trockenen DNA Fragmente aller Reaktionen in 120 µl 1 M Piperidin gelöst und dann bei 90°C 30 min inkubiert. Sie wurden anschließend lyophilisiert. Nach Lösen der Lyophilisate in

100 µl H_2O wurde erneut gefriergetrocknet. Dieser Vorgang wurde noch zweimal wiederholt. Schließlich wurden die Fragmente in 80% Formamid, 10 mM NaOH, 1 mM EDTA, 0,01% Bromphenolblau, 0,01% Xylencyanol gelöst. Nach 1 min bei 94°C und sofortigem Abkühlen in Eiswasser wurden 2 µl Probe auf die Sequenzgele aufgetragen. Gewöhnlich wurden von jedem Fragment 2 Läufe durchgeführt. Lauf 1 wurde beendet, wenn Bromphenolblau 20 cm vom unteren Gelrand entfernt war. Lauf 2 wurde 2 h nachdem Xylencyanol aus dem Gel gelaufen war, beendet. So war es möglich im Durchschnitt etwa 300 Nucleotide vom markierten Ende zu lesen (von Lauf 1 etwa Nucleotid 3 - 150; von Lauf 2 etwa von Nucleotid 100 - 300). Eine Glasplatte des "Gelsandwiches" wurde abgehoben, das Gel auf einen gebrauchten Röntgenfilm übertragen und auf diesem mit Klarsichtfolie bedeckt. In Kassetten wurden Röntgenfilme (DuPont Cronex 4) mit oder ohne Verstärkerfolien 5 h bis 7 Tage exponiert.

2.13 Sequenzieren nach der "Sanger - Methode"

Zum "annealing" des "primers" an die "template" DNA wurde 7,5 µl rekombinierte M13 Einzelstrang DNA mit 1 µl (2 pg) 17mer-"primer" und 1,5 µl 100 mM Tris/HCl (pH 8,0), 100 mM $MgCl_2$ versetzt. Das Gefäß kam in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen, in dem sich ca. 5 ml H_2O befanden. Dieses wiederum wurde in ein 3oo ml Becherglas (mit ca. 40 ml H_2O) gestellt. Das Ganze wurde über dem Bunsenbrenner erhitzt, bis das Wasser zu sieden

begann. Das Abkühlen währte etwa 30 min.

Zu einem "annealing" Ansatz wurden 2 U (0,5 µl) Klenow-Polymerase und 2 µl α-^{32}P dCTP (800 Ci/mmol) pipettiert. Davon wurden je 2,5 µl in mit G, A, T oder C beschriftete, deckellose Eppendorfgefäße aliquotiert. Ebenso werden 2 µl Terminatiosmix (G-Mix in das mit "G" beschriftete Gefäß usw.) so zupipettiert, daß sich die beiden Lösungstropfen nicht berührten. (Die Terminationsmixe enthielten: G-Mix: 6,15 µM dGTP, 123 µM dATP und dTTP, 75 µM ddGTP, 2,5 mM Tris/HCl (pH 8,0), 0,25 mM EDTA; A-Mix: 5,5 µM dATP, 109 µM dGTP und dTTP, 33 µM ddATP, 2,2 mM Tris/HCl (pH 8,0), 0,22 mM EDTA; T-Mix: 5,5 µM dTTP, 109 µM dATP und dGTP, 167 µM ddTTP, 2,2 mM Tris/HCl (pH 8,0), 0,22 mM EDTA; C-Mix: 137 µM dATP, dTTP und dGTP, 17 µM ddCTP, 2,7 mM Tris/HCl (pH 8,0), 0,27 mM EDTA) Durch einen kurzen Zentrifugationsschritt (ca. 10 sec, 18000 g, Raumtemperatur) wurde die Reaktion gestartet. Während der Reaktion wurden die Eppendorfgefäße im Rotor belassen. Nach 15 min wurden 2 µl 0,5 mM aller vier dNTP zugegeben (Ebenfalls durch kurze Zentrifugation). Nach weiteren 15 min wurden 4 µl Formamid, 0,01% Bromphenolblau, 0,01% Xylencyanol auf die gleiche Art zugegeben. Die Proben wurden 4 min ins Wasserbad bei 94°C, anschließend ins Eiswasser gestellt. Umgehend wurden die Sequenzgele mit je 2 µl Probe beladen. In der Regel wurden 2 Gele pro Fragment geladen. Ein 40 cm langes Gel lief, bis Bromphenolblau am Gelunterrand war. Hiervon konnten die Nucleotide 20 - 150 gelesen werden. ein 85 cm - oder 1 m Gel

lief 15 h bis 18 h. Von diesem Gel wurden die Nucleotide 120 - 300 gelesen.

2.14 Injektion von DNA in Oozyten

Einem adulten weiblichen Frosch wurde ein Stück Ovar entnommen. Oozyten der Stadien 5 und 6 (Dumont, 1972) wurden manuell sortiert und bis zum Gebrauch in modifiziertem "Barth-Medium" (88 mM NaCl, 1 mM KCl, 0,82 mM $MgSO_4$, 0,33 mM $Ca(NO_3)_2$, 0,41 mM $CaCl_2$, 2,4 mM $NaHCO_3$, 10 mM Hepes; Gurdon, 1974) aufbewahrt. Die Oozyten wurden in modifiziertem "Barth - Medium" in Petrischalen, die mit Nylongaze ausgelegt waren (Maschenweite 0,8 mm), so ausgerichtet, daß der animale Pol nach oben zeigte. Durch Zentrifugation (15 min, 2000 rpm, Christ Zentrifuge) wurden die Oozytenkerne als dunkle Ringe in der animalen Hälfte sichtbar. In die Oozytenkerne wurden je 20 nl einer Lösung von 0,12 µg/µl Plasmid DNA, 5 µCi/µl α-^{32}P GTP (400 Ci/mmol) in 80 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl (pH 7,5) injiziert. Anschließend wurden die Oozyten für die gewünschte Zeit bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurden bis zu 10 Oozyten in 0,5 ml 10 mM Tris/HCl (pH 7,5), 10 mM NaCl, 1,5 mM $MgCl_2$, 1 mg/ml Proteinase K homogenisiert. Schnellstmöglich wurden 2% SDS zugesetzt. Nach 30 min bei Raumtemperatur wurde 0,3 M Na-acetat zugefügt und 3 X mit 500 µl Phenol/$CHCl_3$ (1/1) und 3 X mit $CHCl_3$ extrahiert. Nach Ethanolfällung wurden die Nucleinsäuren in sterilem H_2O aufge-

nommen, 100 mM Tris/Borat (pH 8,3), 2 mM EDTA, 5 M Urea, 0,01% Bromphenolblau, 0,01% Xylencyanol wurden zugefügt. Durch Erhitzen (5 min, 65°C) wurden die Nucleinsäuren denaturiert. Nach elektrophoretischer Auftrennung auf Sequenzgelen wurde die neusynthetisierte RNA durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

2.15 Klonierung in Plasmid pBR 322

Jeweils ca. 0,o5 µg der gereinigten DNA Fragmente wurden mit ca. 0,5 µg linearisiertem, dephosphorylierten Plasmid pBR 322 (Bolivar et al., 1977) im 10 µl Ansatz ligiert (siehe Kap. 2.16). E. coli HB 101 (Boyer & Roulland - Dussoix, 1969) wurde nach der Methode von Bolivar und Backman (1979) transformationskompetent gemacht. Logarithmische Zellen ($A_{260\ nm}$ = 0,5) wurden in L-Broth Medium (1% Trypton, 0,5% Hefe Extrakt, 0,5% NaCl) abgekühlt, sedimentiert (7500 rpm, GSA Rotor, Sorvall; 2°C, 5 min), in 10 mM NaCl (1 Kulturvolumen) suspendiert und erneut sedimentiert. Die Zellen wurden in 30 mM $CaCl_2$ aufgenommen (1/2 Kulturvolumen) und nach 20 min auf Eis pelletiert. Das Sediment wurde konzentriert in 30 mM $CaCl_2$ (1/15 Kulturvolumen) suspendiert. 300 µl der so präparierten transformationskompetenten Zellen wurden auf je einen Ligaseansatz pipettiert. Nach 1 h auf Eis wurde 75 sec auf 42°C erhitzt. Danach wurde die Suspension 1:10 mit L-Broth verdünnt und 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen sedimen-

tiert und in 1 ml L-Broth aufgenommen und nach 20 min bei 37°C in 200 µl Aliquots auf Agarplatten (L-Broth und entsprechende Antibiotika) plattiert.

Rekombinante Klone wurden in "storage" Medium (6,3 g/l K_2HPO_4, 1,8 g/l KH_2PO_4, 0,45 g/l Na-citrat, 0,09 g/l $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,9 g/l $(NH_4)_2SO_4$, 44 g/l Glyzerin in L-Broth; Gergen et al., 1979) zusätzlich der entsprechenden Antibiotika (10 µg/ml Tetracyclin, 25 µg/ml Ampicillin) bei -80°C aufgewahrt.

2.16 Klonierung in M13 - Phagen

2 µg M13 mp8 oder mp9 DNA (Messing & Vieira, 1982), die mit den gewünschten Restriktionsenzymen verdaut war, wurde zur Dephosphorylierung in 50 µl 25 mM Tris/HCl (pH 8,1), 1 mM EDTA gelöst und mit 0,5 U Alkalischer Phosphatase (aus Kälberdarm) 30 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Erhitzen (5 min, 65°C) in Gegenwart von 5 mM EGTA beendet. Das denaturierte Enzym wurde durch zwei Phenolextraktionen entfernt. DNA Fragmente wurden mit Ethanol ausgefällt. Saubere, trockene DNA Pellets wurden in 10 mM Tris/HCl (pH 7,4), 0,1 mM EDTA zu einer Konzentration von 20 ng/µl gelöst.

Ligiert wurden ca. 0,1 µg DNA Restriktionsfragmente mit 20 ng Vector in einer 10 µl Reaktion, die 66 mM Tris/HCl (pH 7,6), 10 mM Dithiothreitol, 6,6 mM $MgCl_2$, 1 mM ATP enthielt, bei 14°C ("blunt" Enden) oder 4°C ("sticky" Enden) über Nacht mit 0,1 U (Weiss Unit; Weiss et al., 1968). Mit diesem

Ansatz wurden E. coli Zellen des Stammes JM 101 transformiert.

Transformationskompetente Zellen wurden durch die Ca - Schock - Methode erhalten. Frühlogarythmische Zellen ($A_{550\ nm}$ = 0,3) wurden in 50 mM $CaCl_2$ (1/10 Kulturvolumen) suspendiert. Nach 20 min auf Eis wurden die Bakterien pelletiert und in 1/15 des Kulturvolumens 50 mM $CaCl_2$ resuspendiert. Während dieser Prozedur wurde ständig in Eis gearbeitet.
Zu dem 10 µl Ligaseansatz wurden 300 µl "Ca-Zellen" gegeben. Nach 40 min auf Eis und 2 min bei 42°C wurde bei Raumtemperatur 30 µl 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-ß-galaktosid (20 mg/ml Dimethylformamid), 20 µl Isopropyl-ß-D-thio-galaktopyranosid (24 mg/ml), 200 µl frische logarithmische JM 101 Zellen ($A_{550\ nm}$ = 0,5) und 5 ml H-Topagar (1% Bacto Trypton, 0,8% NaCl, 0,8% Agar; 45°C) zugegeben. Die Mischung wurde sofort auf 9 cm 2 X TY - Platten (1,6% Bacto Trypton, 0,5% NaCl, 1% Hefe Extrakt, 1,5% Agar) ausgegossen. Nach Erstarren wurde über Nacht bei 37°C bebrütet. Auf einem Bakterienrasen waren rekombinante M13 - Phagen enthaltene Bakterien als klare "Plaques" (Regionen verringerten Bakterienwachstums; M13 ist kein lytischer Phage) und nicht rekombinante M13 - Phagen enthaltene Bakterien als grüne "Plaques" zu erkennen.

2.17 In - situ Hybridisierung

Mitotische Chromosomen wurden von zerstückeltem Hirngewebe von Xenopus laevis Kaulquappen präpariert (Stadien 39 - 41;

Nieuwkoop & Faber, 1956). Die Tiere wurden mit 0,1% Colchicin in 0,5% NaCl 2 h vorbehandelt. Nach 30 min in 0,075 M KCl wurden die Zellen in Ethanol/Eisessig (3/1) fixiert. Chromosomenspreitungen wurden in 45% Essigsäure mazeriert. In - situ Hybridisierungen wurden nach den Protokollen von Henning (1973) und Gall und Pardue (1975) durchgeführt. Die Chromosomenpräparate wurden in 50% Essigsäure 5 min bei Raumtemperatur vorbehandelt, dann in 0,1 X SSC für 1 min auf 100°C erhitzt, und sofort in Ethanol dehydriert. ^{3}H nicktranslatierte REM Fragmente wurden über Sephadex G-75 gereinigt. Die spezifische Radioaktivität lag bei 2 - 3 X 10^{7} dpm/µg. Gespreitete Chromosomen wurden mit 5 X 10^{5} dpm markierter DNA/10 µl 18 h bei 64°C in 3 X SSC hybridisiert. Die unbedeckten Objektträger wurden ausgiebig in 2 X SSC bei 60°C 2 h gewaschen. Es folgten weitere Waschgänge bei Raumtemperatur. Die Autoradiographie wurde unter Verwendung von Ilford K5 Emulsion über 10 - 16 Tage ausgeführt. Die Präparate wurden mit Kodak D19 Entwickler entwickelt und die Chromosomen in 5% Giemsa Färbelösung gefärbt.

3. Ergebnisse

3.1 Die als cDNA klonierten repetitiven Elemente

3.1.1 Identifizierung von cDNA Klonen, die repetitive Elemente enthalten

Zur Identifizierung repetitiver Sequenzen wurde eine cDNA Klonbank nach der Methode der Koloniehybridisierung untersucht. Die Klonbank wurde dadurch konstruiert, daß E. coli HB 101 mit Hybridplasmiden von dC - elongierten cDNA Sequenzen von polyadenylierter Kern RNA aus Xenopus laevis Embryonen des Gastrulastadiums und dG - elongiertem, Pst I linearisierten Plasmid pBR 322 transformiert wurde (Meyerhof, 1980; John et al., 1982). Als radioaktive Probe fand ^{32}P markierte Genom DNA Verwendung. Von 1000 untersuchten Klonen zeigten acht autoradiographische Signale. Als Beispiel zeigt die Abbildung 1 das Autoradiogramm eines hybridisierten Filters (Filter E) mit 91 Klonen. Es sind drei Signale mit unterschiedlicher Intensität zu erkennen (die Klone F6, G3, H4). Da die Stärke eines Signales von der Konzentration komplementärer Probensequenzen abhängig ist (Grunstein & Hogness, 1975; Grunstein und Wallis, 1979), muß geschlossen werden, daß die beobachteten acht Signale auf Sequenzen zurückgehen, die im Genom häufig vorhanden sind. Das bedeutet, die entsprechenden Klone (sie werden auf Grund ihrer Koordinaten auf den verschiedenen Filtern - A bis J - bezeichnet) BG1, DF7, EF6,

Abbildung 1: Autoradiogramm von 91 Klonen (auf Filter E) der Gastrula cDNA Klonbank nach Hybridisierung mit ^{32}P-Genom DNA.

EG3, EH4, FE8, GF6 und JH12 repräsentieren Transkripte repetitiver DNA. Weiterhin legt die unterschiedliche Intensität der autoradiographischen Signale nahe (der Vergleich EF6/EH4/EG3), daß die durch die Klone repräsentierten repetitiven Elemente innerhalb des Genoms unterschiedlich häufig sind.

Es stellte sich die Frage, ob sich die klonierten Sequenzen unterscheiden, und ob die identifizierten Sequenzen Angehörige verschiedener oder gleicher repetitiver DNA Familien darstellen. Daher wurden die Längen der klonierten Sequenzen bestimmt, sowie Kreuzhybridisierungsversuche durchgeführt. Aus Tabelle 1 wird ersichtlich, daß die Klone BG1, DF7, EG3, EF6, EH4 und GF6 unterschiedlichen Sequenzfamilien angehören.

Tabelle 1: Insertionslängen und Kreuzhybridisierung

Klon	BG1	DF7	EF6	EG3	EH4	FE8	GF6	JH12
Insert.-länge **	200	210	220	140 * 135 50	400	190	450	180
Kreuzhybr. mit ***	—	—	—	—	—	JH12	—	FE8

* Es existieren drei Fragmente auf Grund zwei interner Pst I Schnittstellen.

** Die Insertionslänge wurde elektrophoretisch ermittelt. Plasmid DNA (2 µg) wurde mit Pst I verdaut und zusammen mit Hinf I geschnittener pBR 322 DNA als Größenstandard auf einem 6% Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Wanderungsstrecken wurden gegen den Logarithmus der Fragmentlängen aufgetragen (Daten nicht gezeigt). Daraus wurden die genannten Zahlen hergeleitet.

*** Je 0,1 µg Plasmid DNA wurde Alkali-denaturiert, neutralisiert und in einem Volumen von 10 µl auf Nitrocellulosefilter aufgetragen. Filterstreifen auf denen die DNA aller acht Klone fixiert worden war, wurden individuell mit nicktranslatierter DNA je eines Klones hybridisiert. Die Filterstreifen wurden autoradiographisch untersucht (Daten nicht gezeigt).

Auf Grund dieser Experimente kann jedoch nicht zwischen den klonierten Sequenzen von FE8 und JH12 differenziert werden. Der leichte Größenunterschied kann seinen Ursprung in unterschiedlicher G/C - Elongation haben. Um herauszufinden, ob verschiedene Sequenzen gleicher Familien vorliegen, oder ob die Sequenzen identisch sind, wurde von beiden Klonen eine Restriktionskarte erstellt. Abbildung 2 zeigt, daß Klon JH12 im Gegensatz zu FE8 eine Sau 96I Schnittstelle mehr hat. Daraus folgt, daß die insertierten Sequenzen der Klone FE8 und JH12 verschiedene Mitglieder der gleichen repetitiven Sequenzfamilie sind.

3.1.2 Quantifizierung der als cDNA klonierten repetitiven Elemente

Um festzustellen, wie häufig die einzelnen repetitiven Elemente im Genom vorhanden sind, wurden "dot blots" analysiert (Kafatos et al., 1979). Genau definierte Mengen von Genom- und von Plasmid DNA der cDNA Klone wurden auf Nitrocellulosefilter aufgetragen. Nach Hybridisierung mit der radioaktivmarkierten insertierten Sequenz im Überschuß und nach Auto-

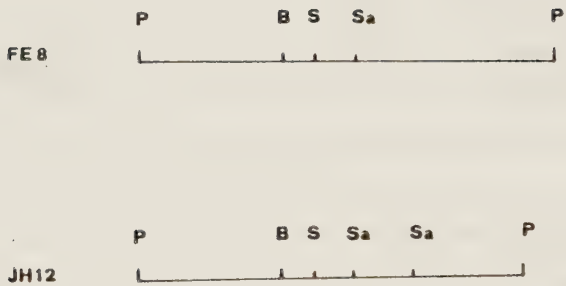


Abbildung 2: Restriktionskarte der klonierten Sequenzen von FE8 und JH12. Je 5 µg Plasmid DNA der Klone FE8 und JH12 wurden nach Abbau mit ((P)st I, (B)am HI, (S)au 3A und (Sa)u 96I auf 6% oder 5% Polyacrylamidgelen elektrophoretisch getrennt. Als Größenstandard wurden Hinf I -, Hpa II -, Sau 3A -, Sau 96I -, oder Hae III - Verdauungen von pBR 322 DNA parallel mit aufgetrennt. Aus halblogarithmischen "plots" wurden die Fragmentgrößen errechnet und die Restriktionskarte abgeleitet.

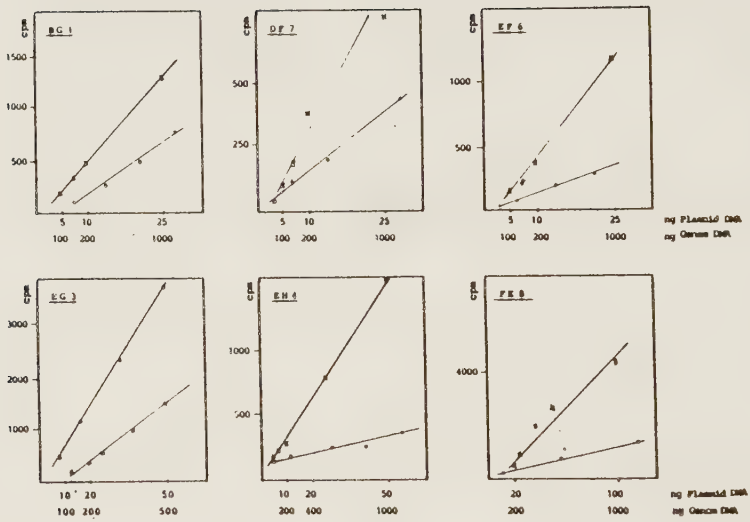
radiographie wurden die individuellen Filtersektionen ausgeschnitten und im Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen. Die Auftragung "gebundene Radioaktivität" versus "aufgetragene DNA Menge" zeigt Abbildung 3. Durch Division der Steigung (cpm/µg) der Genom DNA durch die Steigung der Plasmid DNA läßt sich der Prozentsatz spezifischer Sequenzen am Genom Berechnen. Diese Experimente wurden mehrfach wiederholt (Dabei wichen die Werte um nicht mehr als 30% voneinander ab). Die Tabelle 2 faßt die Ergebnisse aus Abbildung 3 zusammen. Die Werte ligen zwischen 0,024% für Klon DF7 und 1,5%

Tabelle 2: Mengen - und Häufigkeitsabschätzung der als cDNA klonierten repetitiven Elemente.

Klon	BG1	DF7	EF6	EG3	EH4	FE8	GF6	JH12
% des* Genom	0,03	0,024	0,05	1,5	0,09	0,13	0,06	0,2
Kop.-zahl** im hapl. Genom	4,5 X 10^3	3,5 10^3	6 X 10^3	160 10^3	7 X 10^3	19 X 10^3	4,8X 10^3	30 X 10^3

* gemäß der Daten aus Abbildung 3.
**auf Grund der Längen der insertierten Sequenzen und der Größe des Xenopus Genoms.

für Klon EG3. Unter der Annahme, daß das haploide Xenopus laevis Genom 3 X 10^9 BP umfaßt (Dawid, 1965), und aus der Länge der repetitiven Sequenzen (Tabelle 1) läßt sich die


BG 1
DF 7
EF 6
EG 3
EH 4
FE 8
cpm
ng Plasmid DNA
ng Genom DNA

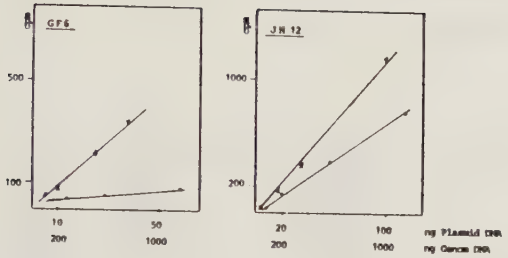
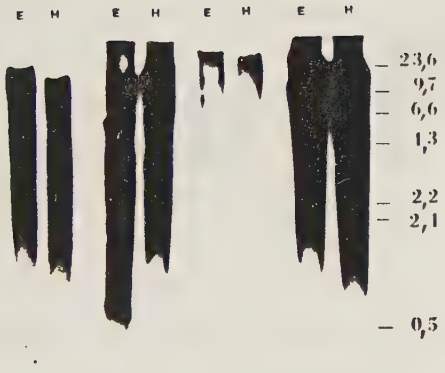


Abbildung 3: Quantifizierung der als cDNAs klonierten repetitiven Elemente. Die Ergebnisse der "Titrations - Hybridisierungsexperimente" sind geplottet als Menge hybridisierter DNA (cpm) gegen die Menge filtergebundener Plasmid DNA (Kreuze) und Genom DNA (Kreise). Steigende Mengen DNA wurden auf den Filtern fixiert. Nach Hybridisierung mit ^{32}P markierter insertierter DNA wurden Filtersektionen ausgeschnitten und im Beckman LS Szintillationszähler gemessen. Um im linearen Bereich messen zu können, wurden unterschiedliche DNA Mengen aufgetragen. Dies bedingt den unterschiedlichen Maßstab.

Häufigkeit der klonierten Elemente im Genom angeben (Tabelle 2). Es ist ersichtlich, daß die Klone BG1, DF7, EF6, EH4, FE8, GF6 und JH12 zur Klasse der mittelrepetitiven DNA gehören. Der Klon EG3 dagegen liegt mit 160000 Kopien schon im Bereich der hochrepetitiven DNA.

3.1.3 Genomorganisation der als cDNA klonierten repetitiven Elemente

Die Genomorganisation der klonierten repetitiven Elemente wurde mit der "Southern" Technik untersucht. Xenopus laevis Genom DNA wurde aus der Leber eines adulten weiblichen Tieres isoliert und nach vollständiger Restriktionsverdauung auf Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt. Nach "Southern" Transfer wurden die Filter mit durch Nicktranslation ^{32}P markierter insertierter Klon DNA hybridisiert. Die Autoradiogramme der "Southern blots" von Eco RI - und Hind III Verdauungen zeigt die Abbildung 4. Die Hybridisierungssignale schmieren in allen Fällen vom hoch - zum niedermolekularen Bereich. Diesem Hybridisierungsschmier aufgelagert sind in den Fällen des Klons DF7 zwei kleine Banden nach Eco RI Abbau (von ca. 0,6 KBP und 0,8 KBP), sowie eine kleine Bande nach (0,4 KBP) Hind III Verdauung. Eine 1,0 KBP Hind III Bande ist nach Hybridisierung mit GF6 DNA erkennbar. Zwei sich nur schwach vom Schmier abhebende Banden von 2,1 KBP nach Eco RI Abbau und von 2,0 KBP nach Hind III Verdauung zeigt die BG1


E H E H E H E H
23,6
9,7
6,6
1,3
2,2
2,1
0,5
1 2 3 4

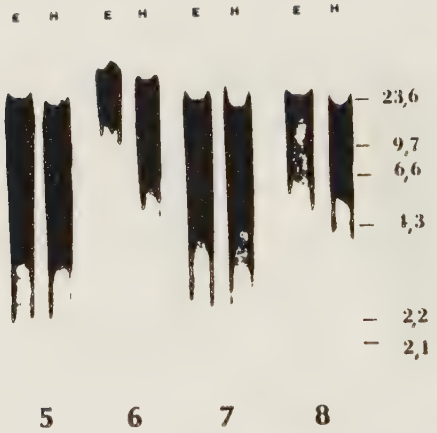


Abbildung 4: Autoradiogramme von "Southern blots" nach Hybridisierung mit ^{32}P markierter insertierter DNA der repetitiven Klone. 7,5 µg Genom DNA wurde vollständig mit (E)co RI oder (H)ind III verdaut. Nach Agarosegelelektrophorese und Transfer wurden die Filter mit ^{32}P DNA der Klone 1) BG1, 2) DF7, 3) GF6, 4) EG3, 5) EF6, 6) EH4, 7) FE8 und 8) JH12 hybridisiert.

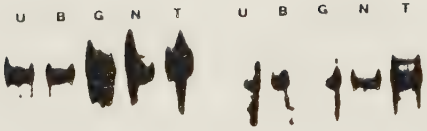
Hybridisierung. Die Signale, die mit Klon EG3 DNA erhalten wurden, lassen erkennen, daß sie aus einer großen Vielzahl kaum aufgelöster, in einander übergehender Banden bestehen. Da zu erwarten ist, daß eine regelmäßige Genomorganisation einer gegebenen Sequenz nur zu einer begrenzten Anzahl verschiedener, hybridisierter Restriktionsfragmenten führen sollte, legt das in Abbildung 4 gezeigte Resultat nahe, daß die klonierten repetitiven Elemente unregelmäßig angeordnet sind und im Genom verstreut vorkommen. Die Banden, die mit DNA von BG1, DF7 und GF6 erhalten wurden, lassen vermuten, daß ein geringer Teil der im Genom vorhandenen repetitiven Elemente regelmäßig in Bezug auf die flankierenden Restriktionsschnittstellen angeordnet ist. Möglicherweise stellen die distinkten, hybridisierten Fragmente kleinere Ausschnitte eines größeren repetitiven Elementes dar. Die EG3 Sequenzen scheinen dagegen nicht so dispers organisiert zu sein. Die Beobachtung, daß noch viele Banden fast aufgelöst sind, kann einerseits bedeuten, daß ein signifikanter Teil der EG3 Sequenzen regelmäßig im Genom organisiert ist. Andererseits besteht die Möglichkeit, daß die EG3 Sequenzen "clustered", in bestimmten Regionen des Genoms gehäuft auftreten. Diese Annahmen werden durch folgende Überlegung gestützt: Je regelmäßiger die Anordnung einer spezifischen Sequenz desto weniger Banden sollten nach Restriktionsverdauung und Hybridisierung entstehen. (Im Extremfall nur eine, wie sie z.B. von Satelliten DNA erhalten werden kann.) Wenn also die EG3 Sequenzen noch ein

fast aufgelöstes Bandenmuster erkennen lassen, so sollte eine bestimmte Regelmäßigkeit vorliegen, zumal z.B. die EH4 Elemente, die viel seltener im Genom vorhanden sind, schon in einem kompletten Schmier resultieren. Die Angehörigen der durch die cDNA Klone definierten repetitiven Sequenzfamilien scheinen eine homogene Sequenzheterogenität untereinander zu haben. Wird die Stringenz der Waschungen der "Southern blots" erhöht, so verschwinden die Signale gleichmäßig, ohne daß bevorzugte Bandenmuster entstehen (Daten nicht gezeigt). Letzteres wäre für den Fall, daß eine der klonierten Sequenz nahe verwandte Subfamilie existiert, aber zu erwarten.

3.1.4 Transkriptionsanalyse der klonierten repetitiven Elemente

Die Isolierung der repetitiven Elemente aus einer cDNA Klonbank bedeutet, daß die korrespondierenden Genomsequenzen auch transkribiert werden. Da aber mit der Methode der Koloniehybridisierung und ^{32}P markierten cDNAs von RNA verschiedener Entwicklungsstadien als Probe nur sehr schwache, nicht eindeutig auszumachende Signale mit den Klonen DF7, EH4 und GF6 und keine Signale mit BG1, EF6, EG3, FE8 und JH12 erhalten wurden (Meyerhof, 1981), wurde die Transkription der zu allen acht identifizierten cDNA Klonen korrespondierenden Sequenzen mit der weitaus sensitiveren "Northern" Technik analysiert (Thomas, 1980; Flytzanis et al., 1982). Aus unbefruchteten

Eiern und aus Embryonen des Blastula -, Gastrula -, Neurulastadiums und aus geschlüpften Kaulquappen wurde RNA extrahiert und durch Zentrifugation durch 5,7 M CsCl von kontaminierender DNA befreit. Glyoxylierte RNA, äquivalent zu einem Embryo, wurde auf Agarosegelen aufgetrennt, auf Nitrocellulosefilter übertragen und mit nicktranslatierter DNA der cDNA Klone hybridisiert. (Die mit GF6 DNA hybridisierte RNA wurde auf Formaldehyd Agarosegelen getrennt. Hier war die RNA von je 4 Embryonen geladen.) Die Autoradiogramme der "Northern blots" zeigt die Abbildung 5. Es ist erkennbar, daß die Sequenzen aller cDNA Klone massiv transkribiert werden. Das Hybridisierverhalten der einzelnen Klone ist unterschiedlich. Die Sequenzen von EG3 und EH4 scheinen Bestandteil von Transkripten sehr unterschiedlicher Größe zu sein, sodaß kein Bandenmuster erkennbar ist. Die Intensität der Signale steigt über das Gastrulastadium zum Kaulquappenstadium an (für EG3 und EH4 sind nur die Hybridisierungen mit der RNA unbefruchteter Eier, Gastrulae und Kaulquappen gezeigt; für GF6 nur die Hybridisierungen mit Neurula - und Kaulquappen RNA). Die Sequenzen der Klone EF6, DF7 und BG1 sind ebenfalls mit Transkripten unterschiedlicher Größe assoziiert. Zusätzlich sind hier aber starke Banden zu erkennen. Währenddem die DF7 Banden im Verlauf der Entwicklung annähernd konstant sind (wegen schlechter Qualität der "blots" auf der Photographie nicht sehr deutlich), variieren die der Klone BG1 und EF6 teilweise stark. Dabei nimmt die gesamte Signalstärke im Verlauf der Embryoge-



BG 1 DF7

EH4 FE8

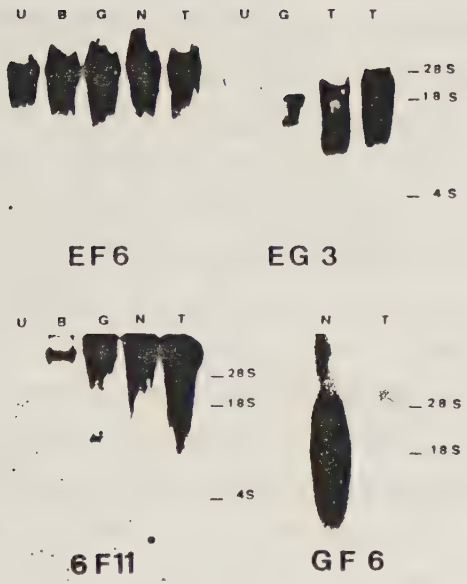


Abbildung 5: Autoradiogramm von "Northern blots" nach Hybridisierung mit ^{32}P DNA der insertierten repetitiven Sequenzen. Glyoxylierte RNA äquivalent zu einem Embryo oder einem unbefruchteten Ei wurde pro Bahn aufgetragen (Für GF6 wurde ein Formaldehyd Agarosegel benutzt und die RNA von 4 Embryonen aufgetragen) Es bedeuten: U) unbefruchtetes Ei, B) Blastula, G) Gastrula, N) Neurula, T) Kaulquappe, C) Kontrolle (Alkalibehandelte RNA Präparation von Kaulquappen um die Hybridisierung mit Genom DNA Resten abzuschätzen; diese Kontrolle wurde in jede Hybridisierung eingeschlossen.

nese vor allem bei Klon BG1 zu. Die GF6 Sequenzen sind nicht in der RNA unbefruchteter Eier nachzuweisen (nicht gezeigt), jedoch finden sich zunehmende Mengen Transkripte im Gastrulastadium. Im Neurulastadium ist ein Maximum erreicht. In Kaulquappen nimmt die Menge an Transkripten wieder ab. Ein besonders interessantes Verhalten zeigen die Klone FE8 und JH12 (wegen der großen Ähnlichkeit der klonierten Sequenzen sind die "Northern blots" identisch; nur FE8 ist gezeigt). Einem leichten Hybridisierungsschmier ist eine dominante Bande aufgelagert, die erheblich größer ist als 28S RNA. Diese RNA Spezies ist vom Blastulastadium an nachweisbar und nimmt in ihrer Intensität stark zu. Ebenso steigt die Intensität des Schmiers. Zusätzlich aber existieren vier streng stadienspezifische Transkripte. Zwei RNA Spezies sind neurulaspezifisch. Eine davon liegt in der Größe zwischen 18S RNA und 28S RNA, die andere ist etwas kleiner als die 18S RNA. Die beiden anderen Transkripte erscheinen in den geschlüpften Kaulquappen. Eine RNA Spezies ist etwas größer, die andere etwas keiner als 28S RNA.

Da FE8 und JH12 ein besonders interessantes Transkriptionsverhalten zeigen, wurde die Transkription der JH12 Familie weiter untersucht. Eine cDNA Klonbank, die von polyadenylierter Kern RNA aus geschlüpften Kaulquappen konstruiert worden war (Knöchel & Bladauski, 1981), ist mit ^{32}P markierter JH12 DNA hybridisiert worden. DNA der Bakterienkolonie 6F11, die als einzige hybridisierte, wurde isoliert und cha-

rakterisiert. Klon 6F11 enthält ein ca. 600 BP cDNA Segment, das ^{32}P markiert wurde. Diese Probe wurde ebenfalls gegen einen "Northern blot" hybridisiert (Abb.5). Die Signale, die erhalten wurden, sind denen der FE8 Sequenz sehr ähnlich, aber eine zusätzliche Bande kleiner als 18S RNA leuchtet schwach im Verlauf der Embryonalentwicklung auf. Weiterhin sind die Banden mit einem erheblich stärkeren Schmier unterlegt. Diese Unterschiede gehen auf die zusätzlichen Sequenzen von ca. 400 BP in 6F11 zurück.

Wenn die repetitiven Anteile der Transkripte, die mit den cDNA Klonen entdeckt worden sind, Bestandteil von mRNA sind, sollte polysomale RNA Hybridisiersignale mit den repetitiven Proben ergeben. Daher wurde ^{32}P markierte JH12 Sequenz gegen einen "Northern blot" hybridisiert, der Kern RNA und polysomale RNA geschlüpfter Kaulquappen enthielt. Das Autoradiogramm zeigt die Abbildung 6. Es ist eine Überbelichtung gezeigt (sie verhindert, daß Banden deutlich werden), die deutlich macht, daß keine Hybridisierung mit der polysomalen RNA stattfand. Also sind die Sequenzen der JH12 Familie zumindest im untersuchten Stadium auf den Zellkern beschränkt.

3.1.5 Sequenzanalyse

Von vier cDNA Klonen wurde die Primärstruktur bestimmt, da die Nucleotidsequenzen Hinweise auf eine Funktion des Transkripts oder eines DNA Segmentes geben kann. Die Abbildung 7 zeigt die

Abbildung 6: Autoradiogramm eines "Northern blots" nach hybridisierung mit ^{32}P JH12 DNA. Je 10 µg Kern RNA (TN) und polysomale RNA (TP) aus geschlüpften Kaulquappen wurde auf Formaldehyd Agarosegelen aufgetrennt.

I

TATTGGCTTT TAATGTGTAC ATGATTTTCT GGTAGACAAG GTATGAAGAT
CCTAATTGCA GAAGGATCCG TTGTCTGGAA AGCCCCAGGT CCCGAGCATT
CTGGATAACA GGTCCCCTAC CTGTACTATT TTTCTGA

II

CTTGTGTATT ATATAGTGAA TAAAGTACTC CCATGGTAAA ATAAGGATAT
TATAAGTCAC TGAGGAGTTT CATGACCGTT TAAAAGCACC CAGTGCTTTT
ATACAGGTCG GCTCCTCGGT ATCCCAAAAT TTTTCAAAA

III

TTTTTTTTTT CCAGGCTTGT CTTATTCATA GTGATGCATA GTTACTAGGT
TAATTTTGAC ACTTTTATGG GTATTGCAAC TGGAGAGCTG CTGAAAAAAA
AGCTAAATGA CTTAAGCTAC AAATAAAATT TTTAAAAAAA AAAAAA

IV

TGCCNNGATG AAGGTAATTA TTAATTTTAG TATGTAATTA ATTATTTATT
AATGTCTATT TTTAAGTAAT TTAATGATTG AATAATAAAA TAGTAGTTTG
TATTTGATTT AACTAAGACA CAACCAATTT TCTCAGAGGT AAACAATTAT
ATTGGGTTTA TTTAATGTTT ACATGGTTTT CCAGTAGACA TAAGGTATGA

AGATCCAAAC CATGGAAAGA CCCCCCATCC GGAAAACTCN AGGTCCTGAG

CACCCCGGAT AAAAGGTCCC ATACCTACAC ACGTAAACAC CCACCCAACC

GAGA

Abbildung 7: Nucleotidsequenzen von JH12 (I), BG1 (II), DF7 (III) und 6F11 (IV). Die Nucleotide nur eines Stranges sind in 5' - 3' Richtung gezeigt. Die Nucleotidsequenzen wurden chemisch bestimmt. Ein N bedeutet das Nucleotid konnte nicht bestimmt werden. Ca. 80% der Sequenzen wurde von beiden Strängen bestimmt. NN in der 6F11 Sequenz bezeichnet die nicht sequenzierte Region von etwa 300 Nucleotiden in 6F11.

Nucleotidsequenzen der insertierten DNA der Klone BG1, DF7, JH12 und 6F11 (partiell). Nur eine der Sequenzen terminiert in einen poly(A) Strech, der den 3' Enden von mRNA ähnlich sieht. Die DF7 Sequenz weist sowohl einen kurzen Adenylsäureschwanz auf alsauch ein vorausgehendes Polyadenylierungssignal. Gleichwohl ist auf Grund des zu kurzen Abstandes von AATAAA zu der poly(A) Anheftungsstelle fraglich, ob die DF7 Sequenz typisch für ein mPNA 3' Ende ist. Obwohl in den klonierten repetitiven Elementen Translationsinitiationscodons vorhanden sind, und die JH12 Sequenz sogar eine Konsensus - Sequenz einer Exon/Intron Grenze aufweist, ist es unwahrscheinlich, daß die klonierten Sequenzen proteincodierend sind, da keine langen offenen Translationslesesinne existieren. Auch kurze direkte - oder invertierte repetitive Sequenzelemente geben keinen Hinweis auf eine mögliche Funktion. Die Nucleotidsequenzen sind mit einer Reihe von publizierten Xenopus Sequenzen auf Homologien verglichen worden. Keinerlei Verwandtschaft wurde mit den BG1 und DF7 Elementen gefunden. Ein Teil der JH12 und 6F11 Sequenz zeigt jedoch eine signifikante Homologie zu der pJCC31 Sequenz, die von Chambers et al. (1982) als ca. 520 BP Fragment aus dem Xenopus Genom isoliert wurde. Vom pJCC31 Element wird vermutet, daß es als Replikationsursprung dient.

3.2 Die REM Sequenzen

3.2.1 Identifizierung und Isolierung von REM Sequenzen

Eco RI Verdauungen von Xenopus laevis DNA zeigen nach Gelelektrophorese und Ethidiumbromidfärbung eine sichtbare Bande von etwa 0,5 KBP, die einem Schmier von Fragmenten aufgelagert ist (Abbildung 8). DNA dieser Bande wurde aus einem Polyacrylamidgel eluiert und in die Eco RI Schnittstelle des Plasmids pBR 322 ligiert. Nach Transformation von E. coli HB 101 wurden 60 zufällig ausgewählte Klone mit der Methode der Koloniehybridisierung untersucht. 36 Klone reagierten mit ^{32}P DNA der 0,5 KBP Bande. Diese müssen also Sequenzen enthalten, die in der DNA der Eco RI Bande hinreichend häufig vorhanden sind. Dagegen sollten die 24 Klone, die kein Hybridisiersignal zeigten, Sequenzen enthalten, die den selteren Sequenzen der 0,5 KBP Region gehören. Diese 24 Klone wurden nicht weiter untersucht.

Um herauszufinden, ob die 0,5 KBP Bande aus einer oder mehreren Hauptkomponenten besteht, wurde ^{32}P markierte DNA des Klons A1 (Abbildung 9) mit den verbeibenden 36 Klonen hybridisiert. 27 Klone zeigten autoradiographische Signale (Abb.9, oben). Hybridisierung ^{32}P markierter DNA des Klons B1, der nicht mit der A1 Probe reagierte, führte zur Entdeckung 7 weiterer Klone (Abb.9, Mitte). Zwei Signale wurden schließlich nach Hybridisierung mit markierter DNA eines der beiden noch verbleibenden Klone (von B8) erhalten (Abb.9,unten).

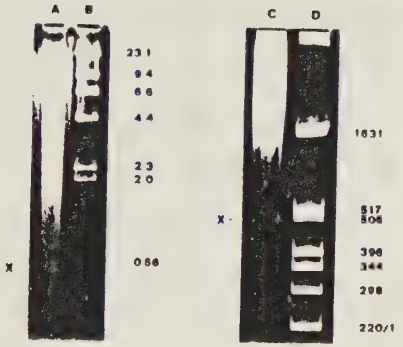


Abbildung 8: Linke Seite: Agarosegelelektrophorese von Xenopus DNA (Eco RI verdaut, A9 und DNA (Hind III verdaut, B). Rechte Seite: Polyacrylamidgelelektrophorese von Xenopus DNA (Eco RI verdaut, C) und pBR 322 DNA (Hinf I verdaut, D). X bezeichnet die Positionen der 500 BP Bande in der Xenopus DNA.

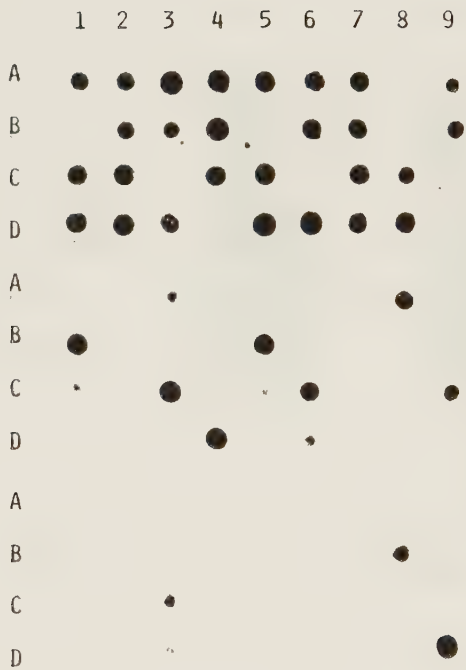


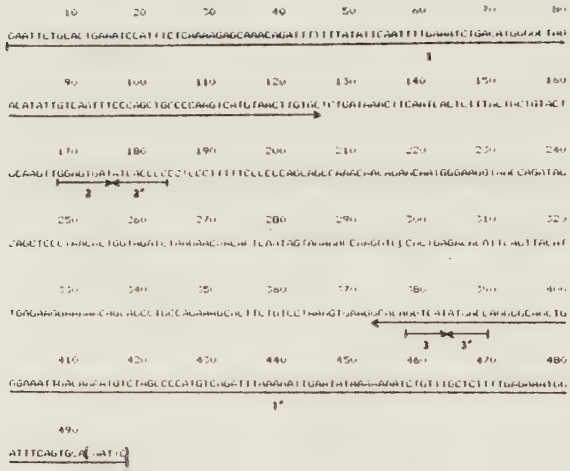
Abbildung 9: Autoradiogramm von 36 rekominanten Klonen nach Hybridisierung mit ^{32}P markierten Eco RI Fragmenten von Klon A1 (oben), Klon B1 (Mitte) und Klon B8 (unten).

Alle Sequenzen, die mit der 0,5 KBP Probe identifiziert worden sind, konnten drei verschiedenen Sequenzfamilien zugeordnet werden. Daraus darf geschlossen weredn, daß alle Hauptkomponenten der 0,5 KBP Eco RI Bande entdeckt wurden. Die drei identifizierten Sequenzfamilien wurden als Repetitive-Eco RI - Monomere bezeichnet: REM1 (Klon A1), REM2 (Klon B1) und REM3 (Klon B8).

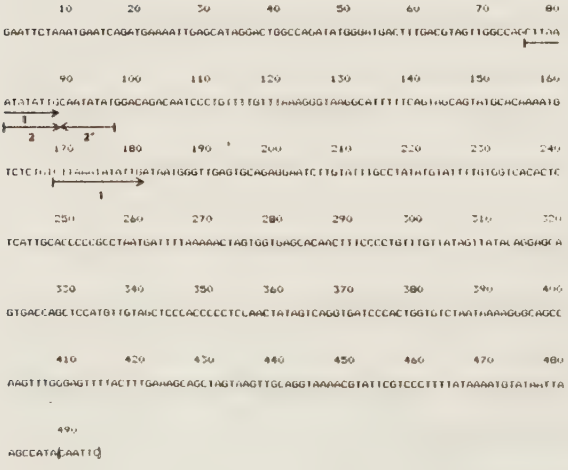
3.2.2 Nucleotidsequenzen der REM Sequenzen

Die Nucleotidsequenzen der REM Fragmente wurden chemisch (REM1, REM2) oder nach Umklonieren in M13 mp8 (REM2, REM3) bestimmt. Mit Hilfe eines Computerprogramms (Larson & Messing, 1982) wurden Sequenzvergleiche durchgeführt, sowie nach direkten oder invertierten repetitiven Sequenzblöcken gesucht. Die 491 BP lange REM1 Sequenz (Abbildung 10A) enthält auffällige, terminale invertierte Sequenzen (1/1') nahezu perfekter Homologie (3 Austauschpositionen von 125). Weiterhin sind zwei Palindrome (2/2' und 3/3') aufgefunden worden. Die terminalen invertierten Strukturen schließen die 5' und 3' Enden des REM1 Fragmentes vollständig ein. Dies mag daraufhindeuten, daß nur ein Teil dieser Strukturen in dem klonierten Fragment enthalten ist, und daß sie sich innerhalb der Genom DNA weiter ausdehnen. Die REM2 Sequenz (Abbildung 10B) weist eine Länge von 487 BP auf. Auch REM2 zeigt ein Palindrom (2/2'). Zusätzlich ist ein direktes repetitives Element (1/1') vor-

A



B



C

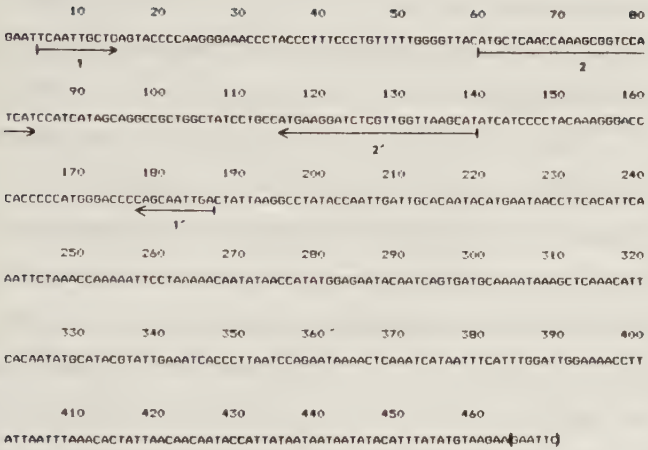


Abbildung 10: Nucleotidsequenzen der REM Fragmente. Die Nucleotide nur eines DNA Stranges von REM1 (Klon A1; (A)), REM2 (Klon B1; (B)) und REM3 (Klon B8; (C)) sind in 5' nach 3' Richtung gezeigt. Unterstrichene Nucleotidblöcke bezeichnen Palindrome, invertierte oder direkte repetitive Sequenzblöcke (siehe Text).

handen. Ein Teil des direkten repetitiven Elementes wird dabei exakt von einer Hälfte des Palindroms repräsentiert. Die REM3 Sequenz (Abbildung 10C) ist mit 463 Nucleotiden etwas kürzer als REM1 und REM2. Das REM3 Fragment enthält zwei palindromische Elemente. Das Erste (1/1') zeigt perfekte Homologie und ist 10 Nucleotide lang. Das Zweite ist 25 Nucleotide lang (2/2') und hat 5 Austauschpositionen. Obwohl die invertierte Struktur 1/1' die andere 2/2' einrahmt und obwohl zwischen beiden komplementäre Homonucleotidblöcke vorhanden sind, läßt der Sequenzvergleich zwischen beiden Strukturen keine Entscheidung darüber zu, ob die beiden Palindrome während der molekularen Evolution aus einer einzigen größeren Vorläuferstruktur hervorgingen.

In allen drei REM Sequenzen wurde nach konservierten Signalsequenzen gesucht, insbesondere nach Promotorelementen für Polymerase II und III. Polymerase III Promotorboxen A und B sind nicht vorhanden.Einige Homonucleotidblöcke könnten dagegen als Polymerase III Terminatoren dienen (Bogenhagen & Brown, 1981). Keine Polymerase II Promotorelemente wurden gefunden; ein potentielles Polyadenylierungssignal wurde entdeckt. Da in allen REM Sequenzen keine längeren offenen Translationslesesinne vorhanden sind, ist es sehr unwahrscheinlich, daß REM Fragmente für Proteine codieren.

3.2.3 Quantifizierung der REM Elemente

Die relativen Mengen der REM Fragmente am Xenopus laevis Genom wurde mit der "dot blot" Methode bestimmt. Definierte Mengen der drei Plasmid DNAs und Genom DNA wurden nach Alkalidenaturierung an Nitrocellulosefilter gebunden. Nach Hybridisierung der Filter mit den korrespondierenden ^{32}P markierten Eco RI Fragmenten und Autoradiographie (Abbildung 11) wurde die gebundene Radioaktivität im Szintillationszähler gemessen. Durch Vergleich der gebundenen Radioaktivität an Plasmid - und Genom DNA ließ sich der Prozentsatz der REM Sequenzen am Genom angeben. Er beträgt 0,4% für REM1, 0,08% für REM2 und 0,02% für REM3. Auf Grund der Länge der REM Sequenzen, sowie der Xenopus Genom Größe von 3×10^9 BP (Dawid, 1966) korrespondieren die Werte zu etwa 25000 REM1 Kopien, 5000 REM2 Kopien und 1200 REM3 Kopien pro haploidem Genom. Diese Ergebnisse korrelieren grob mit den Ergebnissen der Koloniehybridisierung. Gemäß ihrer Häufigkeit gehören die REM Sequenzen in die Klasse der mittelrepetitiven DNA.

3.2.4 Genomorganisation der REM Sequenzen

Die Genomorganisation der REM Sequenzen wurde mit der Methode der "Southern" Hybridisierung, sowie durch in - situ Hybridisierung an mitotische Chromosomen untersucht. Xenopus Genom DNA, die begrenzt oder vollständig mit Eco RI verdaut war und durch Agarosegelelektrophorese der Größe nach aufge-

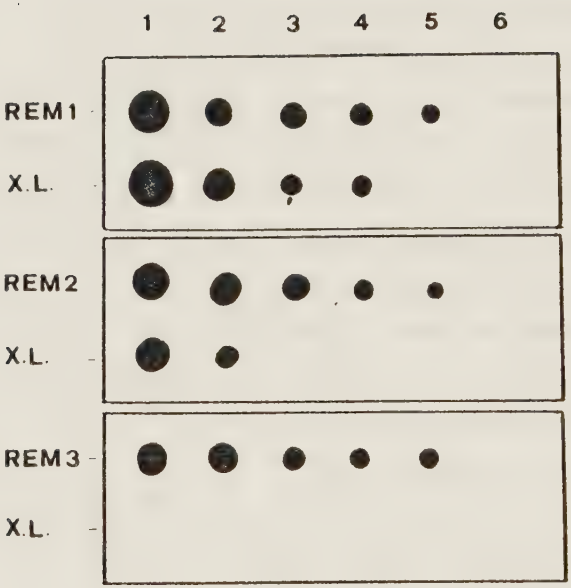


Abbildung 11: Quantifizierung der REM Sequenzen. 0,1 µg Plasmid DNA (REM1, 2 und 3) und 1 µg Xenopus DNA (1) wurden 1:3 (2), 1:10 (3), 1:30 (4), 1:100 (5), 1:300 (6) verdünnt, denaturiert und an Nitrocellulosefilter gebunden. Die Autoradiogramme nach Hybridisierung mit den entsprechenden ^{32}P markierten REM Fragmenten sind gezeigt. Die Filter wurden anschließend im Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen. Die Quantifizierung wurde unter Berücksichtigung des Verhältnisses Plasmidgröße zu Größe der REM Fragmente durchgeführt (10:1; (4361 + 500) / 500).

trennt war, wurde nach Transfer auf Nitrocellulosefilter mit den ^{32}P markierten Fragmenten hybridisiert. Die Autoradiogramme sind in Abbildung 12 gezeigt. Das REM1 500 BP Fragment häuft sich im Verlauf der Verdauung an. Es ist jedoch evident, daß ein Großteil der REM1 Sequenzen selbst nach vollständiger Verdauung in DNA Fragmenten sehr unterschiedlicher Größe enthalten ist. Obwohl sich noch 1 bis 2 Fragmente vom Fragmentschmier abheben, scheinen die REM1 Sequenzen vorwiegend dispers im Genom vorzuliegen. Die REM2 Elemente scheinen ebenfalls dispers organisiert zu sein. Ein deutlich erkennbares Leitermuster von Banden, das im Verlauf des Eco RI Abbaus in das 500 BP Monomer übergeht, zeigt jedoch, daß ein signifikanter Anteil der REM2 Familienmitglieder satellitenartig strukturiert ist. Tandemartig hintereinander wiederholte Fragmente sind die dominierende Organisationsform der REM3 Sequenzen. Dies zeigt das saubere Bandenmuster ohne Hintergrundschmier der "Southern blot" Analyse an. Es ist allerdings möglich, daß einzelne Mitglieder der REM3 Familie im Genom verstreut als Orphons (Childs et al., 1981) vorliegen. Stabile Dimere und Trimere zeigen, daß die Mitglieder der REM3 Familie Veränderungen durch Mutationen unterworfen sind.

In - situ Hybridisierung ^{3}H markierter REM Fragmente an Mitosechromosomen gab Aufschluß über deren Lokalisation. Für die REM1 Familie ist ersichtlich, daß Silberkörner an den meisten Chromosomen zu finden sind (Abbildung 13A und A'). Nach kurzen Expositionszeiten scheinen bevorzugt Telomere

Abbildung 12: Autoradiogramme von DNA "blots" nach Hybridisierung mit ^{32}P markierten REM Sequenzen. Xenopus laevis DNA wurde mit Eco RI (Bahn 1 - 6: 1 U/µg) 0 min (1), 1 min (2), 2 min (3), 3 min (4), 10 min (5), 30 min (6) und 60 min (7; 10 U/µg) verdaut.

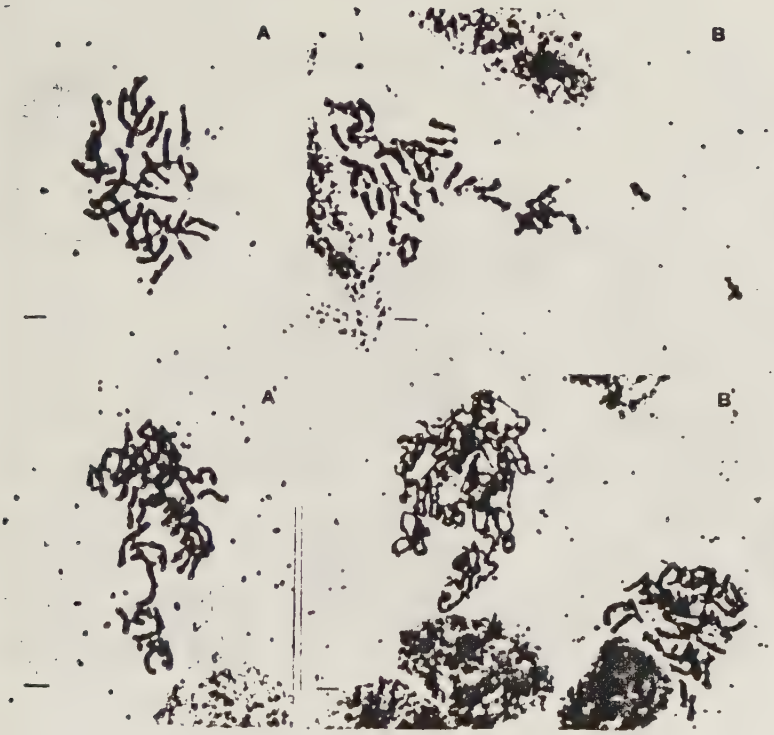


Abbildung 13: In - situ Hybridisierung ^{3}H markierter REM1 Fragmente (A und A') und REM2 Fragmente (B und B') an mitotischen Chromosomen von Xenopus laevis (Metaphasen sind gezeigt; B' zeigt zusätzlich eine Prophase). Die spezifischen Radioaktivitäten der Proben betrugen ca. 2×10^{7} dpm/µg. Es wurde 10 Tage (A und B) und 16 Tage (A' und B') exponiert. Chromosomenspreitungen sind mit Giemsa gefärbt. Striche repräsentieren 10 µm.

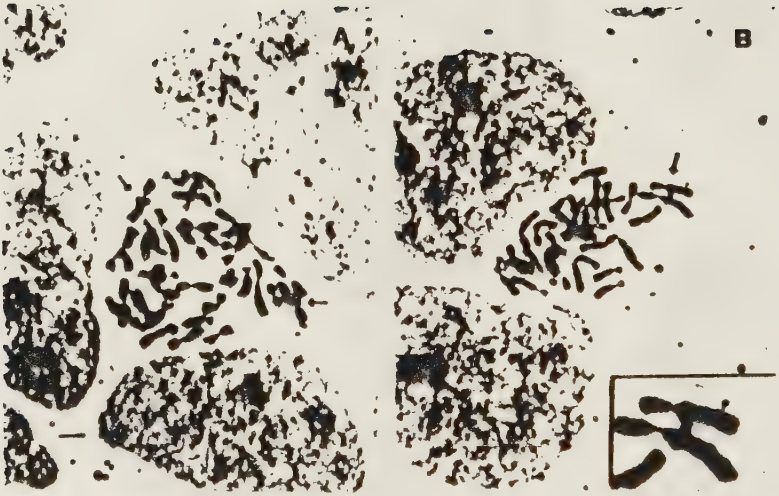


Abbildung 14: In - situ Hybridisierung ^{3}H markiertem REM3 Fragment an zwei Chromosomenspreitungen (A und B) von Xenopus laevis. Ein submetazentrisches Chromosomenpaar zeigt spezifische Hybridisierung an den langen Armen nahe dem Zentromer (Pfeile). Vergrößerte Chromosomen sind als Ausschnitt gezeigt. Die spezifische Radioaktivität betrug 3 X 10^{7} dpm/µg. Die Expositionszeit betrug 10 Tage. Die Chromosomenspreitungen waren Giemsa gefärbt. Die Strichlänge sind 10 µm.

und oft auch zentromerische Regionen geschwärzt zu sein (Abbildung 13A). Nach längeren Expositionszeiten treten Silberkörner zusätzlich an anderen Regionen auf (Abbildung 13A'). Die REM2 Fragmente (Abbildung 13B und B') zeigen kleine Gruppen von Silberkörnern, die nahezu gleichmäßig über alle Chromosomen verteilt sind, ohne an bevorzugte Positionen gebunden zu sein. Die Ergebnisse der REM3 Hybridisierung (Abbildung 14A und B) zeigt dagegen deutlich, daß Silberkörner fast ausschließlich nur an den langen Armen nahe dem Zentromer zweier homologer Chromosomen vorhanden sind. Diese bilden höchstwahrscheinlich das Paar Nr. 1, gemäß dem Karyotyp von Thymovska und Kobel (1972). Sie sind die größten submetazentrischen Chromosomen. Die Homologen des Paares sind in ihrer Größe immer leicht verschieden.

3.2.5 Transkriptionsanalyse der REM Sequenzen

Das Transkriptionsverhalten der REM Sequenzen während der Embryogenese wurde durch die "Northern blot" Analyse untersucht. RNAs, die aus unbefruchteten Eiern und aus Embryonen der verschiedenen Entwicklungsstadien extrahiert und durch CsCl - Gradientenzentrifugation gereinigt worden waren, wurden nach Gelelektrophorese und Transfer auf Nitrocellulosefilter mit den markierten REM Fragmenten hybridisiert. Das Autoradiogramm zeigt die Abbildung 15. Obwohl die RNA durch isopyknische Zentrifugation gereinigt worden war, sind geringe

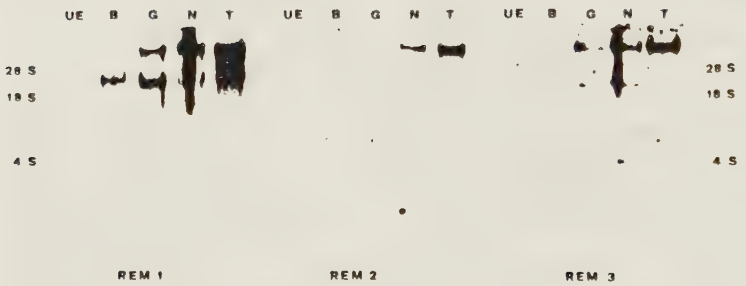


Abbildung 15: Autoradiogramme von RNA "blots" nach Hybridisierung mit ^{32}P markierten REM Fragmenten. Auf jede Bahn wurde die RNA eines unbefruchteten Eis oder eines Embryos aufgetragen. Es bedeuten: UE, unbefruchtetes Ei; B, Blastula, Stadium 7-9; G, Gastrula, Stadium 10-12; N, Neurula, Stadium 15-18; T, geschlüpfte Kaulquappe, Stadium 39-41. Die mit Nummern bezeichneten Stadien entsprechen der Nomenklatur von Nieuwkoop und Faber (1956). Die Positionen von 28S RNA, 18S RNA und 4S RNA sind angegeben.

Mengen noch vorhandener DNA für die hochmolekulare Bande verantwortlich, die nach Hybridisierung mit allen REM Fragmenten zu sehen ist. Diese Banden sind RNAse stabil (Daten nicht gezeigt). Zusätzliche, verschieden große, RNAse sensitive Banden wurden nach Hybridisierung mit den REM Proben erhalten. Nach Hybridisierung mit dem REM1 Fragment erscheint eine dominante Bande, die im Verlauf der Embryogenese in ihrer Intensität ansteigt. Diese RNA Spezies, deren Größe zwischen der der 18 und 28S RNA liegt, akkumuliert in der embryonalen RNA, da die gesamte RNA Menge pro Embryo annähernd konstant ist (4,4 µg im unbefruchteten Ei, 7,3 µg in der geschlüpften Kaulquappe; Bristow und Deuchar, 1964). Die REM2 Sequenz hybridisiert an eine verhältnismäßig kleine RNA Spezies von etwa 300 Nucleotiden. Die höchste Kopienzahl pro Embryo wird offensichtlich während des Gastrula- und Blastulastadiums erreicht. Während REM1 und REM2 Transkripte in allen untersuchten Stadien nachzuweisen waren, ist aus Abbildung 15 auch ersichtlich, daß REM3 Transkripte nur im Gastrula- und Neurulastadium auftreten. Zwei Transkripte sind nachzuweisen. Das Größere, das zwischen 18S und 28S RNA läuft, ist klar erkennbar, wogegen das kleinere Transkript, das schneller ist als 18S RNA,nur schwach zu erkennen ist. Somit demonstriert die Abbildung 15, daß alle REM Familien in distinkte RNA Spezies transkribiert werden, und daß die Transkription unter der Kontrolle der Embryonalentwicklung steht.

3.3 Die RHM Sequenzen

3.3.1 Identifizierung und Isolierung von RHM Sequenzen

Ethidiumbromidgefärbte Agarosegele, auf denen Hind III verdaute Xenopus laevis DNA aufgetrennt wurde, lassen eine Bande von etwa 0,75 KBP erkennen (Abbildung 16 und 17, links). Auf Grund von Absorbtionsmessungen von fünf Polyacrylamidgelen (Abbildung 17 zeigt ein typisches Beispiel) wurde die relative DNA Menge innerhalb dieser Bande mit 0,7% - 1,0% berechnet. Um festzustellen, ob die sichtbare Bande monomere Einheiten einer Satelliten DNA darstellt, wurde die DNA der 0,75 KBP Bande aus dem Gel eluiert und durch Nicktranslation ^{32}P markiert. Mit diesem Material wurde ein "Southern blot" hybridisiert, der unterschiedlich stark Hind III verdaute Xenopus DNA enthielt (Abbildung 17, rechts). Das zu beobachtende leiterartige Bandenmuster, das im Verlauf der Inkubation in zunehmenden Maß in die monomere Form übergeht, ist charakteristisch für Satelliten DNA. Der 120 min Abbau ist die vollständige Verdauung, da auch unter stringenteren Bedingungen keine weitere Verschiebung zum Monomer zu beobachten ist (Daten nicht gezeigt). Zusätzlich zu dem 0,75 KBP Monomer läßt das Autoradiogramm eine Bande von ca. 1,05 KBP erkennen. Die stabilen Dimere und Trimere sollten auf Nucleotidaustausche innerhalb der Hind III Erkennungssequenz beruhen.

Die vom Gel eluierte , radioaktiv markierte DNA der 0,75 KBP Bande wurde auch gegen einen "Southern blot" hybridisiert,

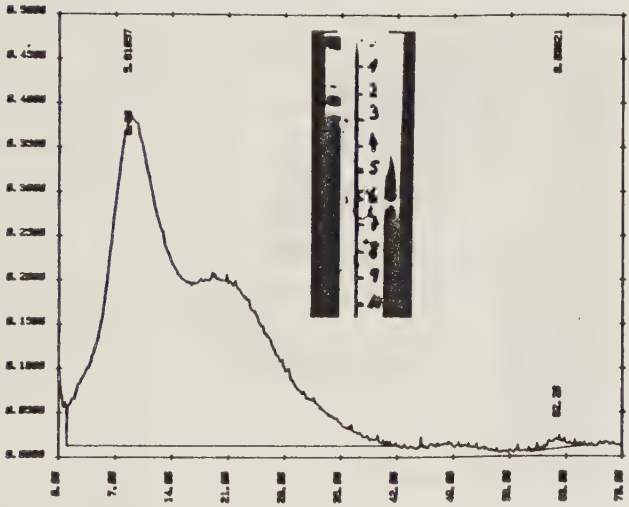


Abbildung 16: Polyacrylamidgelelektrophorese (4%) von Xenopus DNA nach Hind III Abbau. Die Absorbtion wurde bei 260 nm gemessen. Nach Subtraktion des Hintergrundes wurde die relative DNA Menge durch Integration unter Verwendung eines Computerteils berechnet. Der Einschub zeigt ein Ethidiumbromidgefärbtes Gel mit Hind III Fragmenten von DNA (links) und Xenopus DNA (rechts).

Abbildung 17: Links: Ethidiumbromidgefärbtes Agarosegel mit Hind III Fragmenten von λDNA und Xenopus DNA. Rechts: Autoradiogramm eines "Southern blots" von Xenopus DNA, die mit Hind III (1 U/µg DNA) für die angegebenen Zeiten verdaut wurde, nach Hybridisierung mit ^{32}P markierter DNA der 0,75 KBP Bande.

der mit verschiedenen Restriktionsenzymen vollständig geschnittene DNA enthielt (Abbildung 18). Völlig andersartige Bandenmuster wurden mit den einzelnen Enzymen erhalten. Sau 96I führt zu einem extensiven Abbau. Hinf I läßt eine Leiter von kleinen bis hin zu sehr großen Fragmenten sichtbar werden. Dabei existieren wenigstens zwei verschiedene Phasen von Bandenabständen. Dagegen scheint mit Eco RI und Pst I die Hauptmenge der DNA ungeschnitten. Nur ein geringer Teil wird in eine feine Bandenleiter überführt.

Diese Daten lassen auf eine gewisse Heterogenität der 0,75 KBP Bande schließen. Für einen besseren experimentellen Zugang der vermuteten verschiedenen Elemente wurden die aus dem Gel eluierten 0,75 KBP Fragmente in die Hind III Schnittstelle des Plasmids pBR 322 ligiert. Nach Transformation des E. coli Stammes HB 101 wurde die Plasmid DNA von sechs zufällig ausgewählten Klonen Hind III oder Eco RI und Bam HI verdaut und elektrophoretisch untersucht (Daten nicht gezeigt). Dabei zeigte sich, daß die RHM1, 2, 4, 6 und 10 genannten Klone (RHM steht für Repetitives Hind III Monomer) Fragmente von etwa 0,75 KBP enthalten, wogegen RHM3 ein scheinbar artifizielles Dimeres enthält. Die Klone RHM1, RHM2 und RHM4 wurden weiter untersucht. Die insertierten Sequenzen der drei Klone wurden nach Hind III Verdauung, ^{32}P Markierung mit "Southern blots" hybridisiert, die unterschiedlich stark mit Hind III verdaute Xenopus DNA enthielt. Das Autoradiogramm (Abbildung 19) demonstriert eindeutig, daß die RHM1, RHM2

Abbildung 18: Autoradiogramm eines "Southern blots" von mit Sau 96I (S), Eco RI (E), Hinf I (H), oder Pst I (P) geschnittener Xenopus Genom DNA, die mit ^{32}P markierter DNA der 0,75 KBP Hind III Fragmente hybridisiert wurde.

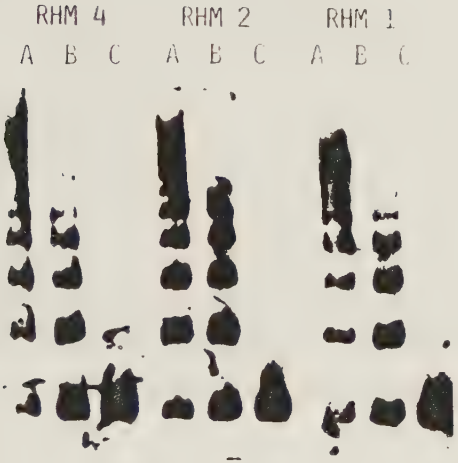


Abbildung 19: Autoradiogramm von "Southern blots", die drei unterschiedlich stark Hind III verdaute Xenopus DNA enthalten (A,B,C) und mit DNA von RHM4, RHM2 und RHM1 hybridisiert wurden.

und RHM4 Sequenzen integraler Bestandteil von Xenopus Satelliten DNA sind, und nicht nur zufällig auf Grund ihrer Größe kloniert worden sind.

Um zu untersuchen, ob die RHM Sequenzen Angehörige einer oder mehrerer repetitiver Sequenzfamilien sind, wurden von den RHM1, RHM2 und RHM4 Fragmenten Restriktionskarten erstellt. Abbildung 20 zeigt die einander sehr ähnlichen Restriktionskarten von RHM1 und RHM4. In Abbildung 21 ist die Restriktionskarte von RHM2 zu sehen, die von denen für RHM1 und RHM4 völlig verschieden ist. Dieses Ergebnis legt nahe, daß die klonierten RHM Fragmente zwei verschiedenen Sequenzfamilien angehören. Weiterhin lassen die Restriktionskarten der Abbildung 20 (RHM1 und RHM4) auf Grund ihrer Ähnlichkeit mit publizierten Daten (Brownlee & Cartwright, 1974; Federoff & Brown, 1978; Miller et al., 1978) vermuten, daß RHM1 und RHM4 Monomere der wohlbekannten oozytenspezifischen 5S DNA darstellen. Die Sequenzanalyse der RHM1 und RHM4 Fragmente (Abbildung 22 und 23) lieferte den abschließenden Beweis für diese Annahme.

3.3.2 Quantifizierung der RHM2 Sequenz

Die relative Menge von RHM2 Sequenzen am Genom wurde durch die "dot blot" Analyse bestimmt. Definierte Mengen Xenopus Genom DNA und Plasmid DNA von RHM1 und RHM2 wurden nach Alkali - Denaturierung an Nitrocellulosefilter fixiert. Nach

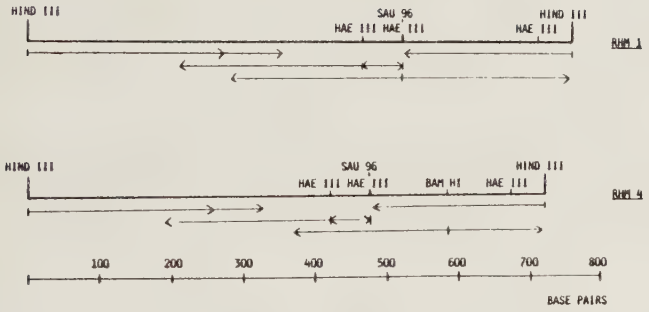


Abbildung 20: Restriktionskarten der klonierten Sequenzen RHM1 und RHM4 Fragmente. Die Pfeile zeigen die Richtung und die Länge der sequenzierter Bereiche der angezeigten Fragmente an. Das größte und drittgrößte Hae III Fragment wurde nach Strangtrennung sequenziert.

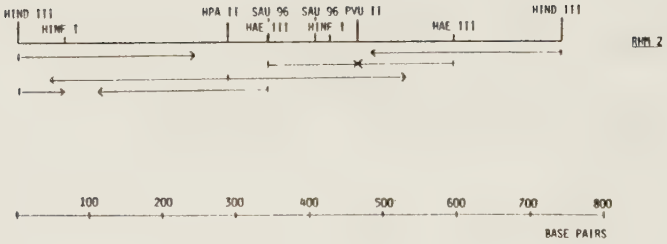


Abbildung 21: Restriktionskarte der klonierten Sequenz RHM2. Die Pfeile geben Richtung und Länge der sequenzierten Bereiche der angezeigten Restriktionsfragmente an.

```
        10         20         30         40         50         60         70         80
AAGCTTCATTTTTTCAAGGTTTTATTTTTTAAAGTTTTCAAAGTTTGAGTTTTCAAAGTTTGAGTTTTCAAAGTTTGAGT

        90        100        110        120        130        140        150        160
TTTCAAAGTTCGAGTTTTCAAAGTTTGAGTTTTCAAAGTTTGAGTTTTCAAAGTTCGAGTTTTGAAAGTTTGAGTTTTCA

       170        180        190        200        210        220        230        240
AAGTTTTCAAAGTTTAATTTTTCAAAGTTTTCAACGTTTTCAAAATTTGATTTTTCAAAGTTTTCAAAGTTTAAATTTTT

       250        260        270        280        290        300        310        320
CAAAGTTTTCAAAGTTTGATTTTTTCAACGTTTTCAAGGTTTGATTTTTCAACGTTTTCAAAGTTTCATTTTTTCAACGT

       330        340        350        360        370        380        390        400
TTTCAACGTTTTCAAGGTTTGATTTTTCAACGTTTTCAAAGTTTCATTTTTCAGTTTTCAGTTTCATTTTTCAAAGTTTC

       410        420        430        440        450        460        470        480
ATTTCATTTTCCACAGTACCGCTGACAAGTCAAGAAGCCGAAAAGTGCCGCTGTTCGTCGCCTACGGCCACACCACCCTG

       490        500        510        520        530        540        550        560
AAAGTGCCTGATCTCGTCTGATCTCAGAAGCGATATAGGGTCGGGCCTNGTTAGTACCTNGATGGGAGACCGCCTGGGAA

       570        580        590        600        610        620        630        640
TACCANGTGTCGTAGGCTTTTCAAAGTTTTCAACTTTATTTTGCCACAGCATCGCCGACAAGTCATGGAGCCAAAAGGTG

       650        660        670        680        690        700        710        720
CTGCTGTTCATCGCCTATAGCCACACTGAAAGTGCCTGCTCTCGTCTGATCTGTGAAGTGATACAGGGGCAGGCCTNGTT

       730        740        750        760        770        780        790        800
AGTACCTNGATGGGAGACCGCCTGAGAAGTTTTCA
```

Abbildung 22: Nucleotidsequenz von RHM1. Die Nucleotide nur eines Stranges sind in 5' - 3' Richtung gezeigt.

```
        10         20         30         40         50         60         70         80
AAGCTTCATTTTTTCAAGGTTTGATTTTTTAAAGTTTTCAAAGTTTGAGTTTTCAAAGTTTGAGTTTTCAAAGTTTGAGT

        90        100        110        120        130        140        150        160
TTTCAAAGTTTGAGTTTTCAAAGTTCGAGTTTTCAAAGTTTGAGTTTTCAAAGTTTCAAAGCCCAATTTTTCAAAGTTT

       170        180        190        200        210        220        230        240
TCAACGTTTTCAAAATTTGNTTTTTCAAAGTTTTCAAAGTTTAAATTTTTTCGTTTAAATTTTTTCAAAGTTTTCAAAGT

       250        260        270        280        290        300        310        320
TTGATTTTTTCAACGTTTTCAAGGTTTGATTTTTCAACGTTTTCAAAGTTTCATTTTTTCAACGTTTTCAAGGTTTGATT

       330        340        350        360        370        380        390        400
TTTCAACGTTTTCAAAGTTTAATTTTTCAGTTTTCAGTTTCATTTTTCCACAGTGCCGCTGACAAGTCAAGAAGCCGAAA

       410        420        430        440        450        460        470        480
AGTGCCGCTGTTCGTCGCCTACGGCCACACCACCCTGAAAGTGCCTGATCTCGTCTGATCTCAGAAGCGATACAGGGTCG

       490        500        510        520        530        540        550        560
GGCCTNGTTAGTACCTNGATGGGAGACCGCCTGGGAATACCANGTGTCGTAGGCTTTTCAAAGTTTTCATCTTTATTTTG

       570        580        590        600        610        620        630        640
CCACAGCATCGCCGACAAGTCATGGATCCAAAAGGTGCTGCTGTTCATCGCATATAGCCACACTACCCTGAAAGTGCCTG

       650        660        670        680        690        700        710        720
CTCTCGTCTGATCTGTGAAGTGATACAGGGGCAGGCCTNGTTAGTACCTNGATGGGAGACCGCCTGAGAAGTTTTCA
```

Abbildung 23: Nucleotidsequenz von RHM4. Die Nucleotide nur eines Stranges sind in 5' - 3' Richtung gezeigt.

Hybridisierung des Filters mit ^{32}P markierter DNA von Klon RHM2 und Autoradiographie (Abbildung 24) wurden individuelle Filtersektionen im Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen. Auf Grund gebundener Radioaktivität wurde berechnet, daß der Anteil der RHM2 Sequenz am Genom 1,35% beträgt. Die gleichen Experimente ergaben für die RHM1 und die RHM4 Sequenzen einen Wert von 0,5% (nicht gezeigt). Aus Abbildung 24 wird weiterhin deutlich, daß die RHM2 Sequenz nicht mit der oozytenspezifischen 5S DNA kreuzhybridisiert, und so die Annahme unterstützt, daß die RHM2 Sequenz einer anderen Sequenzfamilie zugehörig ist.

3.3.3 Sequenzanalyse des RHM2 Fragmentes

Gemäß der Restriktionskarte wurde das RHM2 Fragment nach der Maxam - Gilbert Methode sequenziert. Die Nucleotidsequenz zeigt die Abbildung 25. Das RHM2 Element ist 745 BP lang. Die Analyse der Sequenz mit Hilfe eines Computerprogramms ergab die Präsenz einiger kurzer repetitiver Sequenzblöcke (invertiert und direkt), die zu "stem - loop" Strukturen führen können. Die Polymerase III Promotorboxen A und B (Traboni et al., 1982) sind klar zu erkennen. Auch sind Polymerase III Terminatoren vorhanden (Bogenhagen & Brown, 1981). Der Vergleich der RHM2 Sequenz zu publizierten Xenopus Sequenzen ergab, daß es sich bei der RHM2 Sequenz um eine enge Verwandte der kürzlich beschriebenen 741 BP Satelliten 1 DNA (Lam & Carroll, 1983) und der 746 BP OAX DNA (Ackerman, 1983) handelt.

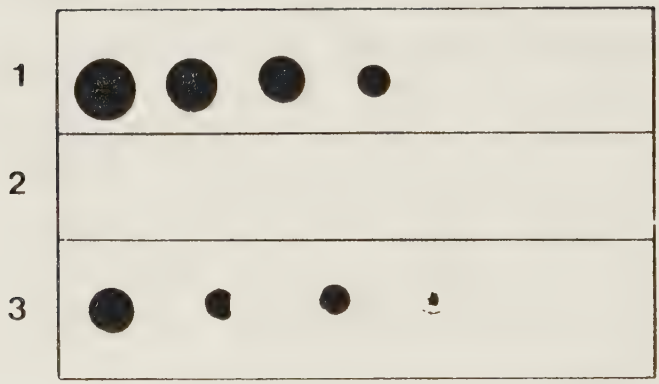


Abbildung 24: Autoradiogramm der "dot blot" Analyse. Filtergebundene sonicierte Xenopus DNA (3) und Hybrid Plasmide RHM2 (1) und RHM1 (2) wurden mit ^{32}P markierter DNA der klonierten RHM2 Sequenz hybridisiert. Folgende Mengen DNA wurden fixiert: 0,38 µg Genom DNA (verdünnt 1:5, 1:7,5, 1:10, 1:25, 1:50); 0,46 µg RHM2 und 0,39 µg RHM1 Plasmid DNA (verdünnt 1:5, 1:10, 1:5o, 1:100, 1:250). Gebundene Radioaktivitäten wurden im Beckman 230 Szintillationszähler gemessen.

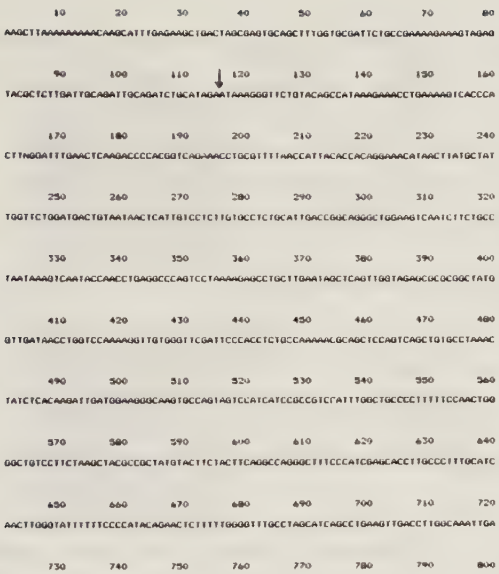


Abbildung 25: Nucleotidsequenz von RHM2. Die Nucleotide nur eines Stranges sind in 5' - 3' Richtung gezeigt. Der Pfeil markiert die Insertionsposition, in der zusätzliche Nucleotide in der RHM5 Sequenz (siehe Abb. 30 und 31, sowie Kap.3.3.5) vorhanden sind.

3.3.4 Isolierung von Genom Fragmenten aus einer Cosmid Bibliothek

Um einen genaueren Einblick in die Genomorganisation der RHM2 Sequenz zu bekommen, wurde eine Bibliothek von Cosmid Klonen durch Koloniehybridisierung mit ^{32}P markierter RHM2 Sequenz untersucht. Wie auf Grund des hohen Gehaltes dieser Sequenz in der Genom DNA zu erwarten war, reagierte eine sehr große Anzahl von Klonen mit der Probe. Sieben Klone wurden zufällig ausgewählt und weiter untersucht. Die rekombinanten Klone wurden mit verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten und nach Transfer auf Nitrocellulosefilter mit der RHM2 Probe hybridisiert (Ethidiumbromid gefärbte Gele und die Autoradiogramme von zwei Klonen cosXL25B6D1und cosXL30F1A12 zeigt die Abbildung 26). Die durch diese Experimente erhaltenen Restriktionskarten sind aus Abbildung 27 zu entnehmen. Für Klon cos XL25C4F10 konnte keine Restriktionskarte hergeleitet werden. Aus Abbildung 27 ist ersichtlich, daß verschiedene monomere Formen der RHM2 Sequenz vorliegen. Die häufigste Form, das 0,75 KBP Monomer, ist in den Klonen cosXL25B6D1, cosXL18F12E1 und cosXL18G4D1 vorhanden. In diesen rekombinanten Klonen ist das Monomer je 32 X, 31 X und 14 X anwesend. In den Klonen cosXL30F1A12, cosXL18F8E10 und cosXL18A7G12 wurde dagegen eine monomere Form von ca. 1,05 KBP entdeckt. Da diese 1,05 KBP Form stark mit der RHM2 Sequenz kreuzhybridisiert (siehe Abb. 26), muß sie wenigstens einen Teil der RHM2 Sequenz enthalten; es muß aber noch zusätzliche 0,3 KBP Sequenzinforma-

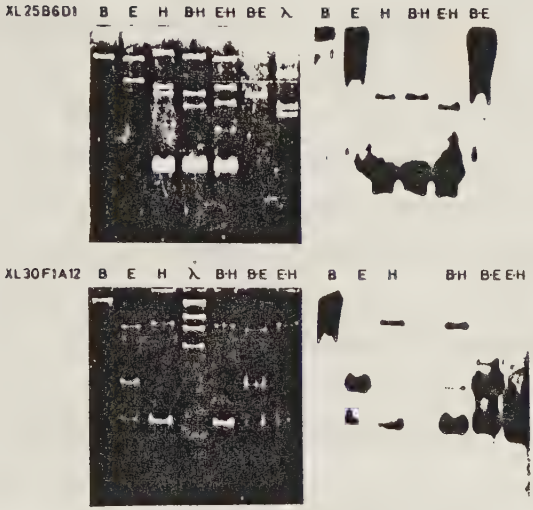


Abbildung 26: Agarosegel von cosXL30F1A12 und cosXL25B6D1 nach Verdauung mit (H)ind III, (E)co RI, (B)am HI, sowie mit den Kombinationen der Enzyme. Hind III Fragmente von DNA wurden als Größenstandard mit aufgetrennt (links). Die Autoradiogramme nach "Southern" Transfer und Hybridisierung mit der RHM2 Probe sind rechts gezeigt.

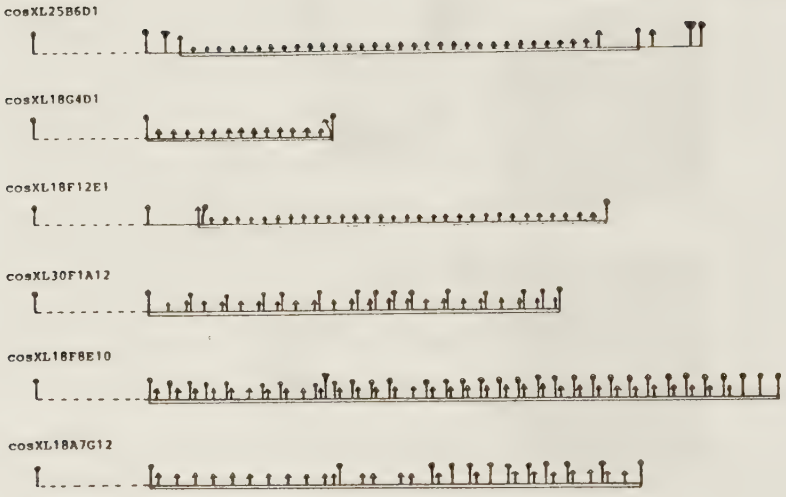


Abbildung 27: Restriktionskarten der Cosmid Klone. Unterbrochene Linien bezeichnen die Vector Sequenzen von pHC79. Doppelte Linien markieren die Regionen, die mit der RHM2 Probe hybridisieren. Die Lokalisation der Eco RI Schnittstellen (↑) innerhalb der 1,05 KBP Hind III (↑) Monomere sind zufällig eingezeichnet, da ein Teil der Monomere geschnitten wird, ein Teil nicht geschnitten wird und zudem nicht bekannt ist, ob die Eco RI Schnittstellen regelmäßig angeordnet sind. (↑) bedeuten Schnittstellen für Bam HI.

tion vorhanden sein. Es ist anzunehmen, daß dieser monomere Typ für die 1,05 KBP Bande nach Hind III Verdauung von Genom DNA verantwortlich ist (Abb.17) und das feine leiterartige Bandenmuster nach Eco RI Verdauung von Genom DNA hervorruft (Abb.19). Das 1,05 KBP Fragment ist in cosXL18F8E10 31 X vertreten. Der Klon cosXL18A7G12 weist das 1,05 KBP Monomer 14 X auf. Zusätzlich sind aber auf Grund von Mutationen innerhalb der Hind III Erkennungssequenz stabile Dimere vorhanden (Abb. 27). Weiterhin gibt es 0,5 KBP und 1,5 KBP Fragmente, die möglicherweise aus den stabilen Dimeren durch Nucleotidaustausche in einer Hind III Schnittstelle resultieren. Eine solche Hind III Erkennungssequenz würde z.B. durch einen einzigen G - C Übergang in Position 528 des 1,05 KBP Elementes entstehen (vergleiche Abb. 30). Wäre das betreffende Element Teil eines Dimeren, so hätten die resultierenden Fragmente eine Größe von 0,525 KBP und 1,549 KBP. Dies entspricht den tatsächlich beobachteten Größen. Der nicht kartierte Klon cosXL25C4F10 zeigt ein sehr komplexes Bandenmuster (Abb.28). Die mit der RHM2 Probe identifizierten Hind III Fragmente weisen eine Größe von 0,75 KBP auf. Aus Abbildung 28 geht hervor, daß andere Fragmente, die nicht mit der RHM2 Sequenz hybridisierten, mit ^{32}P markierter Genom DNA reagierten. Da unter den verwendeten Bedingungen nur repetitive Sequenzen autoradiographische Signale hervorrufen, ist evident, daß RHM Sequenzen in ihrer genomischen Nachbarschaft andere bisher unbekannte repetitive Elemente haben. Ferner wird klar,

Abbildung 28: Agarosegelelektrophorese von λDNA nach Verdauung mit Hind III (A) und cosXL25C4F10 DNA nach Eco RI/Hind III Verdauung (B). Nach "Southern" Transfer wurden die in (B) gezeigten Fragmente mit ^{32}P markierter RHM2 DNA (C) oder mit ^{32}P markierter Xenopus Genom DNA (D) hybridisiert.

daß in cosXL25C4F10 Fragmente mit ^{32}P Genom DNA keine autoradiographischen Signale geliefert haben und daher Einzelgensequenzen enthalten sollten.

3.3.5 Sequenzanalyse des 1,05 KBP Monomers

Die Frage nach der Natur des 1,05 KBP Monomers wurde mit Hilfe der Sequenzanalyse angegangen. Durch Hind III Verdauung wurden die 1,05 KBP Fragmente aus cosXL30F1A12 herausgeschnitten. Nach Isolierung der 1,05 KBP Bande aus einem Polyacrylamidgel wurde eine Restriktionskarte der als RHM5 bezeichneten Sequenz erstellt (Abb.29 & 30) und die Konsensussequenz nach Maxam-Gilbert bestimmt. Das war möglich, weil keine Längenheterogenität der Monomere untereinander besteht, und weil die Häufigkeit von Nucleotidaustauschen begrenzt ist. Die RHM5 Sequenz hat eine Länge von 1037 Nucleotiden. Der Vergleich der RHM5 mit der RHM2 Sequenz zeigt, daß der Größenunterschied zwischen beiden Fragmenten auf eine 287 BP Insertion zurückgeht (Nucleotide 117-403, die zwischen die Nucleotidpositionen 115/116 der RHM2 Sequenz zu lokalisieren sind; vergleiche Abb. 25). Ansonsten weisen beide Sequenzen eine Homologie von 84,3% auf. Die Sequenzunterschiede beruhen auf 15 Deletionen, 20 Insertionen und 82 Substitutionen. Die Analyse der 287 BP Insertion zeigt zu Anfang und Ende der Insertion zwei etwa 55 BP Sequenzblöcke, die eine mehr als 70%ige Homologie zu den Nucleotiden 1-56 und 57-112 der RHM2 und der RHM5 Sequenz haben. Das in-

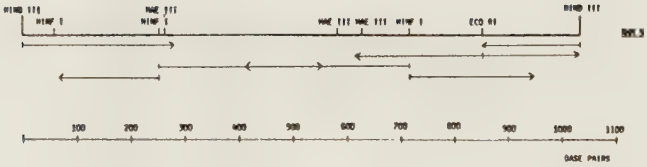


Abbildung 29: Restriktionskarte von RHM5 und sequenzierte Restriktionsfragmente. Hinf I Fragmente von RHM5 wurden nach Strangtrennung sequenziert. Die Pfeile geben Richtung und Länge sequenzierter Bereiche an.

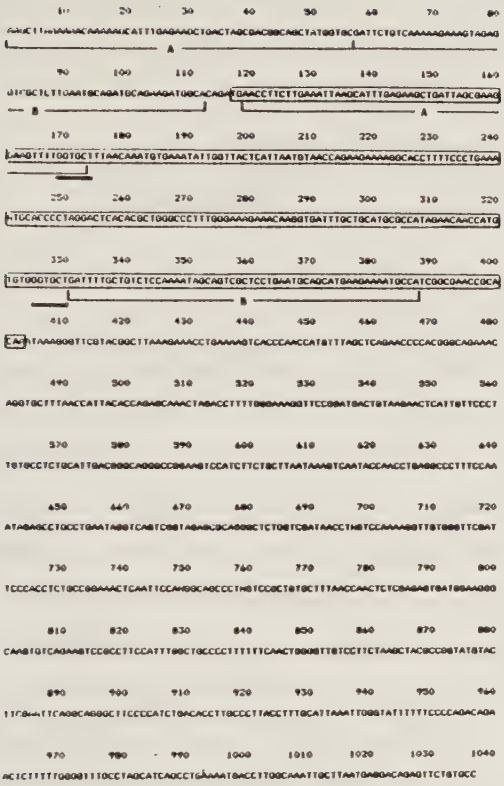


Abbildung 30: Nucleotidsequenz von RHM5. Die Sequenzanteile, die nicht in RHM2 vertreten sind, sind eingekastelt. Die Nucleotide nur eines Stranges in 5' - 3' Richtung ist gezeigt. Unterstrichene Regionen (A&B) bezeichnen die Sequenzelemente, die in der insertierten Sequenz ebenfalls vohanden sind. Die dicken Linien bezeichnen die flankierenden direkten repetitiven Hexanucleotidblöcke.

sertierte Element seinerseits wird innerhalb dieser Blöcke durch zwei kurze repetitive Elemente 5'-GGTGCT-3' flankiert. Eine schematische Darstellung der Struktur des 1,037 KBP Monomers zeigt Abbildung 31.

3.3.6 Transkriptionsanalyse von RHM2 und RHM5

Um zu untersuchen, ob die Polymerase III Promotoren, die auf Grund von Sequenzvergleichen in RHM2 und RHM5 festgestellt worden sind, auch als solche funktionsfähig sind, wurde die Transkription dieser Sequenzen nach Injektion in Xenopus Oozyten analysiert. Nach Umklonieren in pHC 79 wurde das 0,75 KBP Monomer von RHM2, die 0,75 KBP Multimere als cosXL25B6D1, sowie die 1,037 KBP Multimere als cosXL30F1A12 zusammen mit α-^{32}P GTP in die Kerne von Xenopus Oocyten gespritzt. Als Kontrolle dienten der Vector pHC 79 und die oozytenspezifische 5S DNA (RHM1 nach Umklonieren in pHC 79). Ebenfalls wurde α-^{32}P GTP allein injiziert. Nach Inkubation der Oozyten wurden Nucleinsäuren extrahiert und auf Polyacrylamid/Urea Gelen untersucht (Abbildung 32). Nach 3 h Inkubation der Oozyten nach Injektion mit RHM1 Hybridplasmiden sind signifikante Mengen an 5S RNA angehäuft. Dies spricht für eine korrekte Transkription der injizierten 5S DNA. Im Falle der pHC 79 Kontrolle sind geringe Mengen an 5S RNA und 4S Transkripten zu sehen. Die 5S RNA scheint dabei auf einer endogenen Synthese zu beruhen. Dies wird auf Grund von 5S Banden geschlos-

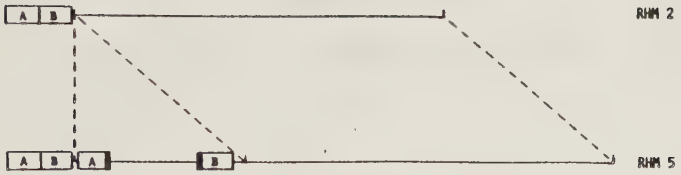


Abbildung 31: Schematische Darstellung von RHM2 und RHM5. Die Insertion in RHM5 mit den duplizierten Blöcken A und B, sowie die Lage des Verdoppelten Hexanucleotidblocks ist gezeigt.

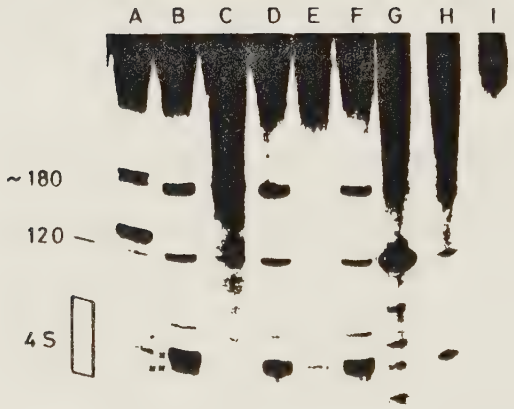


Abbildung 32: Autoradiogramm von ^{32}P markierter RNA, die aus Xenopus Oozyten nach Injektion verschiedener Cosmide und unterschiedlicher Inkubationszeiten extrahiert wurde. A)cosXL 30F1A12, 3 h; B) cosXL30F1A12, 15 h; C) cosXL25B6D1, 3 h; D) cosXL25B6D1, 15 h; E) cosRHM2, 3 h; F) cosRHM2, 15 h; G) cos RHM1, 3 h; H) pHC 79, 12 h; I) pHC 79, 3 h. Die Positionen von 5S RNA und einer Hefe tRNA Mixtur (Boehringer) ist angegeben. Die Bedeutung der Sterne ist im Text erläutert.

sen, die auch nach Injektion von α-^{32}P GTP allein vorhanden sind. Dagegen scheint das 4S Transkript (durch einen Stern gekennzeichnet) von pHC 79 Sequenzen abzustammen, da die Produkte endogener Synthese einen umfassenden Größenbereich abdecken und nicht als diskrete Banden erscheinen. Eine Bande von 4S Größe ist von anderen Autoren auch bei der in - vitro Transkription von pBR 322 und pHC 79 beobachtet worden (Wittig & Wittig, 1982). Die Transkription von cosXL30F1A12 zeigt nach 3 h Inkubation eine dominante Bande von ca. 130 Nucleotiden. Außerdem sind Banden von 190 - 200, sowie von ca. 75 Nucleotiden zu sehen. Nach 15 h Inkubation akkumulieren dagegen Banden von etwa 180 Nucleotiden und etwa 4S Größe. Nicht mehr nachweisbar sind 130 und 190 - 200 Nucleotid Transkripte. Die 180 Nucleotid RNA korrespondiert höchstwahrscheilich zu dem OAX Transkript, von dem gezeigt wurde, daß es eine Größe von 181 Nucleotiden aufweist (Wakefield et al., 1983; Ackerman, 1983). Nach der Injektion von RHM2 und cosXL25B6D1 wird kein 130 Nucleotid Transkript synthetisiert, sondern es häufen sich 4S RNAs und 180 Nucleotid RNAs an. Nach Injektion aller drei rekombinanter Klone (RHM2, cosXL25B6D1, cosXL30F1A12) ist die 4S Bande nach 15 h Inkubation erheblich stärker als in der pHC 79 Kontrolle. Weiterhin wird ein anderes 4S Transkript sichtbar, daß nach Injektion der pHC 79 DNA fehlt (mit zwei Sternen gekennzeichnet). Außerdem deutet die Form der mit einem Stern gekennzeichneten Bande , die nach Injektion mit den rekombinanten Klonen erhalten wurde, daraufhin, daß hier zwei

Transkripte annähernd gleicher Größe vorliegen, von denen nur eins in der pHC 79 Kontrolle zu finden ist.

Das Transkriptionsverhalten der 1,05 KBP Monomere von cosXL30F1A12 nach 3 h Inkubation ist verschieden von dem nach 15 h, und dem der 0,75 KBP Fragmente aus cosRHM2 und cosXL25 B6D1. Um der Frage, ob unterschiedliche Regionen des 1,05 KBP Monomer transkribiert werden, nachzugehen, wurden die 0,75 KBP Fragmente von cosXL25B6D1 und die 1,05 KBP Fragmente von cosXL30F1A12 nach Hind III Verdauung isoliert. Die so von Fremdsequenzen befreiten Fragmente wurden nach Hae III Verdauung auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt. Der Hae III Abbau resultiert in drei Banden (143, 258, 344 BP) für die RHM2 Sequenz und in vier Banden (45, 254, 318, 420 BP) für die RHM5 Fragmente. Nach Elektrotransfer auf DBM Papier wurden die RHM2 Fragmente mit ^{32}P RNA aus mit cosXL25B6D1 injizierten Oozyten hybridisiert und die RHM5 Fragmente wurden mit ^{32}P RNA aus mit cosXL30F1A12 injizierten Oozyten hybridisiert (Abbildung 33). Das Autoradiogramm macht deutlich, daß homologe Regionen (das 258 BP Fragment aus cosXL25B6D1 und das 254 Bp Fragment aus cosXL30F1A12) beider RHM Elemente transkribiert werden, die wiederum beide mit der OAX DNA Region übereinstimmen, die transkribiert wird (Ackerman, 1983). Das bedeutet jedoch, daß eine zeitabhängige Verschiebung der Größe der Transkripte existiert, die wiederum wahrscheinlich auf Grund unterschiedlicher Benutzung von Terminatoren beruht (siehe Diskussion).

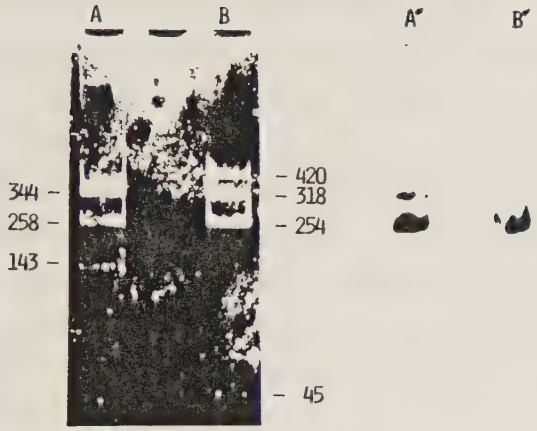


Abbildung 33: Links: Gelelektrophorese von A) Hae III Verdauungen der 745 BP Fragmente aus cosXL25B6D1 und B) Hae III Vardauungen der 1037 BP Elemente aus cosXL30F1A12 in 5% Polyacrylamidgelen. Rechts: Autoradiogramm der links gezeigten Fragmente nach Elektrotransfer auf DBM Papier und Hybridisierung mit ^{32}P markierter RNA aus Oozyten, die mit A') cosXL 25B6D1 injiziert worden war und 15 h inkubiert wurde und B') die mit cosXL30F1A12 injiziert worden war und 3 h inkubiert wurde.

4. Diskussion

4.1 Die als cDNA klonierten repetitiven Elemente

Die Koloniehybridisierung einer cDNA Klonbank von polyadenylierter Kern RNA aus Xenopus laevis Gastrulae (Meyerhof, 1981) mit ^{32}P markierter Genom DNA führte zur Isolierung von acht Klonen, die repetitive DNA enthalten. Keiner dieser Klone lieferte eindeutige Signale mit einer cDNA Probe, die von embryonaler RNA hergestellt worden war. Ähnliche Beobachtungen wurden auch von Crampton et al. (1981) an einer cDNA Klonbank von menschlicher Lymphozyten RNA gemacht. Beide Ergebnisse lassen vermuten, daß die RNA Subpopulationen, die repetitive Elemente tragen, nicht identisch mit den in polyadenylierter RNA häufig vorhandenen Sequenzen sind. Demzufolge werden die in dieser Arbeit identifizierten Sequenzen möglicherweise sehr schnell degradiert, oder aber - sehr viel wahrscheinlicher - die repetitiven Anteile werden aus hochmolekulareren RNA Vorläufern während der "processing" Mechanismen entfernt. Zwei weitere Möglichkeiten sollen nicht unerwähnt bleiben, auch wenn sie als sehr unwahrscheinlich angesehen werden: Erstens könnten repetitive Elemente auf Grund von DNA Kontaminationen der RNA Präparation als genomische DNA mit kloniert worden sein. Dann sollten bevorzugt die häufigsten im Genom vertretenen Sequenzen vorhanden sei; das ist offensichtlich nicht der Fall. Zweitens ist am Beispiel von Maus B1 Elementen in erythroleukämischen "Friend" Zellen bekannt, daß nicht poly-

adenylierte RNA auf Grund von intermolekularen Duplexen mit polyadenylierter RNA coisoliert wird (Balmain et al., 1982). Dadurch könnten diese Transkripte nach "Zufallspriming" zwar kloniert worden sein, würden aber nur schwach in der ^{32}P cDNA Sequenzpopulation vertreten sein. Gegen diese Möglichkeit spricht jedoch der Befund, daß beispielsweise die DF7 Sequenz in einen Adenylsäurestrech terminiert. Die wahrscheinlichste Erklärung ist daher, daß die repetitiven Elemente von den Vorläufersequenzen schnell entfernt werden, sodaß sie in "steady state" polyadenylierter RNA nur schwach vertreten sind. Diese Annahme wird durch die geringe Größe der klonierten Sequenzen unterstützt, die folglich fast ausschließlich aus repetitiver DNA bestehen.

Kreuzhybridisierungsexperimente ergaben, daß selbst unter nicht stringenten Bedingungen keine Verwandschaft zwischen sieben Sequenzen besteht. Zwei Elemente hybridisieren jedoch sogar unter stringenten Bedingungen miteinander. Auf Grund einer Restriktionsschnittstelle konnte gezeigt werden, daß es sich nicht um identische Sequenzen, sondern um zwei nahe Verwandte derselben Sequenzfamilie handelt. Für alle identifizierten Elemente kann gelten, daß sie im Genom verstreute, repetitive Elemente darstellen, die zu unterschiedlich umfangreichen Sequenzfamilien gehören. Das sehr häufige EG3 Element muß schon in die Klasse der hochrepetitiven DNA eingeordnet werden. Die anderen Elemente gehören dagegen in die Klasse der mittelrepetitiven DNA. Die Differenz zwischen der

Kopienzahl des FE8 und des JH12 Elementes - zweier Angehöriger der gleichen Sequenzfamilie - kann durch die experimentellen Abweichungen (ca. 30% siehe "Ergebnisse") erklärt werden. Möglicherweise könnte auch ein Teil eines Elementes divergiert sein und daher für die unterschiedliche Kopienzahl verantwortlich sein.

Die Untersuchung der Expression der klonierten repetitiven Elemente zeigte, daß alle Sequenzen stark transkribiert werden. Für die Expression der JH12, FE8, GF6 Elemente ist evident, daß sie einer Kontrolle der Entwicklung unterliegt. Auch die Sequenzen der BG1, EG3 und EF6 Elemente werden differentiell exprimiert; Die Transkription nimmt während der Embryogenese zu. Die Sequenzen DF7 und EH4 sind etwa gleichermaßen in den RNAs der untersuchten embryonalen Stadien vertreten. Die zu beobachtende leichte Intensitätszunahme der autoradiographischen Signale kann nicht als signifikant gewertet werden. Für die meisten Sequenzen gilt aber, daß der quantitativ größte Unterschied zwischen Blastula- und Gastrulastadium liegt, und so die allgemein erhöhte Transkriptionsrate nach dem "mid blastula transition" wiederspiegelt (Newport & Kirschner, 1982a + b). Allen klonierten repetitiven Elementen ist gemein, daß sie offensichtlich Bestandteil von mehreren oder vielen Transkripten unterschiedlicher Größe sind. Dieses wirft die Frage auf, ob die repetitiven Elemente an der koordinierten Genexpression Anteil haben, oder ob zufällig in Transkriptionseinheiten liegende repetitive Sequenzen mit andersartig regu-

lierten Genen cotranskribiert werden. Es ist zur Zeit nicht möglich, hierüber eine Entscheidung zu treffen. Repetitive Elemente, die an 5' oder 3' Enden von vermutlichen mRNAs oder deren Vorläufer liegen, sind an einigen Beispielen beschrieben worden (Zuker & Lodish, 1981; Tchurikov et al., 1982; Carpenter et al., 1982; de Lange et al., 1984; Kindle & Firtel, 1984; Chung et al., 1983; Sutcliffe et al., 1984; Spohr et al., 1981) und in den meisten Fällen ist gezeigt worden, daß sie stadienspezifisch oder gewebsspezifisch exprimiert werden. Wennauch die Befunde der Gewebsspezifität oder der Stadienspezifität nicht als Beweis für eine Einbeziehung repetitiver Elemente in Kontrollmechanismen der Genexpression gelten können, so sprechen sie immerhin gegen die Annahme, daß sie nur zufällig in differentiell abgelesenen Transkriptionseinheiten liegen. Der Grund dafür ist, daß die hier betrachteten Elemente über das Genom verstreut sind und folglich in vielen Transkriptionseinheiten vorkommen müssten. Dieses wiederum würde die Wahrscheinlichkeit einer spezifischen Expression herabsetzen, die aber tatsächlich beobachtet wird.

Für ein hier beschriebenes Element (JH12) ist gezeigt worden, daß komplementäre Transkripte nur in der Kern RNA vorhanden sind. Dies würde auf regulatorische Aspekte hindeuten, wenn der Nachweis gelänge, daß die an das repetitive Element assoziierten Sequenzen funktionell bedeutsam wären, z.B. indem sie als mRNA translatiert und nicht wie das repetitive Element selbst im Zellkern degradiert würden. Da die insertierte

Sequenz im Klon JH12 sehr klein ist, und offenbar nur aus repetitiver DNA besteht, ist dazu leider keine direkte Möglichkeit gegeben. Wennauch zu diesem Zeitpunkt noch keine endgültige Aussage gemacht werden kann, so sei immerhin angeführt, daß "sandwich" Hybridisierungen nahe legen, daß Sequenzen, die im Genom nahe (ca. 2 KBP) bei den JH12 Elementen lokalisiert sind, als polysomale RNAs während der Embryogenese auftreten (Daten nicht gezeigt). Diese Beobachtung wird auch durch die Analyse von drei isolierten Genomklone untermauert, die alle sowohl mit der JH12 Probe alsauch mit markierter cDNA reagieren (Daten nicht gezeigt). Die Verfügbarkeit der Genomklone und des cDNA Klons 6F11, der außer der JH12 homologen Sequenz noch andere DNA enthält, ermöglicht nunmehr der Frage nachzugehen, welche Bedeutung die mit den repetitiven Elementen kotranskribierten , nicht repetitiven Sequenzen haben und ob das repetitive Element an der Regulation der Transkription oder an posttranskriptionellen Mechanismen beteiligt ist.

Ein häufig angeführtes Argument gegen eine Beteiligung repetitiver Elemente an der Regulation der Genexpression, ist die offensichtliche zufällige Verteilung bestimmter repetitiver Elemente in bestimmten Gen Loci (vergleiche z. B. Ryffel et al., 1983). Daher wurde begonnen, die beiden Xenopus laevis Globingen "cluster", soweit sie kloniert sind (zusammen über 120 KBP; siehe Hosbach et al., 1983), auf die Lokalisation repetitiver DNA zu untersuchen. Dabei wurden mehrere Regionen entdeckt, die über die gesamten 120 KBP verstreut

und die repetitive DNA enthalten. Die Lokalisation der JH12 Sequenz wurde genauer untersucht. Die Ergebnisse zeigen, daß vier Mitglieder der JH12 Familie vorhanden sind, die nicht zufällig im Globingen "cluster" verstreut vorkommen, sondern in Bezug auf die Gene regelmäßig angeordnet sind (Ergebnisse in dieser Arbeit nicht gezeigt). Dieses Ergebnis ist umso erstaunlicher, als daß repetitive DNA oft mit genetischer Instabilität und folglicher Zufallslokalisation in Zusammenhang gebracht wird (Ryffel et al., 1983; Calabretta et al., 1982).

Die Sequenzanalyse von vier der beschriebenen Sequenzelemente zeigte wegen der Existenz von Translations - Stopcodons, daß entweder die repetitiven Elemente von mRNA Vorläufern während ihrer Reifungsprozesse entfernt werden müssen, oder aber an den nicht translatierten 5' oder 3' Termini liegen. Damit bestätigt die Sequenzanalyse Ergebnisse, die mit Hybridisierungs- und Translationsexperimenten gewonnen wurden (Meyerhof et al., 1982; Richter et al., 1984). Diese Untersuchungen legten nahe, daß Populationen von Transkripten, in denen repetitive- mit nicht repetitiven Bereiche wechseln, in - vitro nur mit geringer Effizienz translatiert werden. Diejenigen RNA Populationen, die weitgehend arm an repetitiven Anteilen sind und die mit den vorgenannten Spezies in einer Vorläufer - Produkt Beziehung stehen, werden dagegen in - vitro mit hoher Ausbeute translatiert.

Der Vergleich der Sequenzdaten zu publizierten Sequenzen zeigte, daß das JH12 Element der pJCC31 Sequenz sehr ähnlich

ist, die möglicherweise als Replikationsursprung dient (Chambers et al., 1982). Ob die stadienspezifische Transkription eines dieser Elemente mit der Replikation in Zusammenhang steht, kann bislang nicht entschieden werden. Doch die kürzlich beschriebenen Methoden zur Isolierung von DNA Sequenzen eukaryotischer Replikationsursprünge (Anachkova et al., 1984; Zannis-Hadjopoulos et al., 1981) mögen hierfür die experimentelle Voraussetzung liefern. Der Umstand, daß nun vier Angehörige der JH12 Familie sequenziert sind (2 in dieser Arbeit; 1 im Xenopus Globingen "cluster", β_I^A ; pJCC31), erlaubt es, ein Kern Element zu definieren (Abbildung 34), das offensichtlich stark konserviert ist, wohingegen die flankierenden Regionen stark divergieren. Das gezeigte Kern Element weist eine Länge von etwa 120 Nucleotiden auf, lediglich das Element aus β_I^A dehnt sich nur über 90 Nucleotide aus. Dafür aber wird eine weitere kurze homologe Region in den 3' Bereichen von β_I^A und 6F11 beobachtet (nicht gezeigt). Es wäre interessant zu wissen, ob dieses so definierte Kern Element das eigentliche repetitive Element darstellt, und ob es transponierbar ist. Die Daten von Chambers et al.(1982) und die Analyse der β_I^A Region zeigen direkte repetitive Sequenzblöcke, die in einigem Abstand das Kern Element umgeben. Die direkt flankierenden Sequenzen sind jedoch in diesen beiden Fällen verschieden, sodaß keine Homologien mehr zu erkennen sind. Das hieße aber, ein potentielles transponierbares Element (begrenzt durch die di-

```
B↑A  :  AATTGGGTTTATTTAAAGTTTAAATGATTTTCTGGTACAGTTAAGGCATGAAGATCCAAATTACAGAAAGATCCATTATCCTG
JH12 :  TATTGGCTTT.T..AATGTTTACATGATTTTCTGGTAGACA..AGGTATGAAGATCCTAATTGCAGAAGGATCCGTTGTCTGG
6F11 :  TATTGGGTTTATTTAATGTTTACATGGTTTTCCAGTAGACATAAGGTATGAAGATCCAAACCATGGAAAGACCCCCCATCCGG
PJCC31: TATTGGGTTTATTTAATGTTAACATGATTTTCTAGAAGATTTAAGGAATAAAGATCAAAATGAAGGAAAGATGCGTTATCTGG

B↑A  :  AAAA
JH12 :  AAAGCCCCAGGTCCCGAGCATTCTGGATAACAGGTCCCCTACCT
6F11 :  AAAACTCNAGGTCCTGAGCACCCCGGATAAAAGGTCCCATACCT
PJCC31: AAAGCCCTAGGTCCCGAGCATTCTGGATAACAGGTCCCATACCT
```

Abbildung 34: Das Kern Element der JH12 Familie. Das Kern Element wurde definiert als der gemeinsame homologe Bereich von vier Mitgliedern der JH12 Familie (siehe Text).

rekten repetitiven Sequenzblöcke) würde größer sein als das Kern Element.

4.2 Die REM Sequenzen

Die Koloniehybridisierung hat ergeben, daß die nach Ethidiumbromidfärbung sichtbare 0,5 KBP Bande Eco RI verdauter, elektrophoretisch aufgetrennter Xenopus laevis DNA aus drei Hauptkomoponenten besteht. Diese als REM1, REM2 und REM3 bezeichneten Komponenten weisen je 25000, 5000 und 1200 Kopien im haploiden Xenopus Genom auf. Somit gehören sie gemäß der Definition von Singer (1982) in die Klasse der mittelrepetitiven DNA.

Die Mitglieder der verschiedenen REM Familien weisen unterschiedliche Genomorganisationen auf. Die Mitglieder der REM1 Familie scheinen gemäß der "Southern blot" Analyse im Genom verstreut vorzuliegen. Doch die Beobachtung, daß ein Teil der REM1 Sequenzen konservierte Eco RI Erkennungssequenzen aufweisen (die zur Anhäufung der REM1 Sequenz in der 0,5 KBP Bande führt), sowie das Vorhandensein zusätzlicher größerer Banden die in der "Southern" Analyse erkennbar sind, mag Indiz für eine nicht zufällige Organisationsform eines Teiles der REM1 Sequenzen innerhalb des Genoms sein. Diese Vermutung wird unterstützt durch die Ergebnisse der in - situ Hybridisierung, die eindeutig zeigen, daß nach kurzer Expositionszeit bevorzugt telomerische- und zentromerische Regionen geschwärzt

sind. Eine auffällige Struktur sind die langen , terminalen invertierten repetitiven Sequenzblöcke der REM1 Sequenz. Sie lassen vermuten, daß das genomische repetitive Fragment nicht vollständig kloniert wurde. Dennoch ist klar, daß diese Strukturbesonderheit für die Ausbildung sogenannter "stem - loop" Strukturen signifikanter Stabilität verantwortlich ist, die als Bestandteil möglicher Kandidaten für transponierbare Elemente im Xenopus Genom in Betracht kommen (Perlman et al., 1976). Das 1723 Element, (Kay & Dawid, 1983), von dem vermutet wird, daß es ein Transposon darstellt, zeigt ebenfalls terminale invertierte repetitive Sequenzblöcke. Bei Drosophila sind Transposons mit diesen besonderen Strukturmerkmalen gut bekannt (Truett et al., 1981). Da die Enden der vollständigen genomischen Sequenz nicht bekannt sind, war nicht fetzustellen, ob eine "Zielstellenduplikation" stattgefunden hat. Die Verdopplung eines kurzen Nucleotidblocks am Ort der Insertion eines Transposons auf Grund eines "staggered breaks" (Jagadeswaran et al., 1981) wäre ein weiteres Charakteristikum für eine Transposition. Die Analyse einer Bibliothek von Genomfragmenten sollte helfen, diese Frage anzugehen.

Die REM2 Sequenzen zeigen eine etwas komplexere Genomorganisation. Ein Teil dieser Sequenzen ist sicherlich über das Genom verstreut. das leiterartige Bandenmuster der "Southern" Analyse zeigt jedoch an, daß ein signifikanter Anteil tandemartig organisiert ist. Diese Organisationsform mag sich auch in den "clustern" von Silberkörnern nach kurzer in - situ

Hybridisierung wiederspiegeln, die möglicherweise durch Hybridisierung der Probe an viele Kopien des REM2 Elementes in enger genomischer Nachbarschaft erzeugt werden. Ein interessanter Aspekt der REM2 Sequenz hinsichtlich einer möglichen Transposition ist die Überlagerung von direkten und invertierten repetitiven Elementen. Möglicherweise hat die Bildung des Palindroms eine Insertion des durch die kurzen repetitiven Nucleotidblöcke begrenzten Sequenzelementes erleichtert oder ein schon vorhandengewesenes Palindrom mag als "Zielstelle" gedient haben.

Die REM3 Sequenz repräsentiert im Gegensatz zu REM1 und REM2 eine typische Satelliten DNA. Die "Southern blot" Analyse, sowie die in - situ Hybridisierung geben keinerlei Hinweis auf eine andere Organisationsform. Dennoch kann, da jede Methode nur eine begrenzte Sensitivität aufweist, nicht ausgeschlossen werden, daß einzelne REM3 Sequenzen im Genom verstreut sind. Es liegt aber nahe, daß die meisten der 1200 Kopien der REM3 Familie nur an einem chromosomalen Lokus vorhanden sind.

Bemerkenswert ist die Transkription der REM Sequenzen, die offensichtlich unter der Kontrolle der Embryonalentwicklung steht. Höchst interessant ist die Frage nach der biologischen Bedeutung der Transkripte. Doch weder die Sequenzanalyse noch ein Computer - Vergleich der REM Sequenzen mit mehr als 50 publizierten Xenopus Sequenzen lieferte einen Hinweis auf eine mögliche Bedeutung. Die Größe der Trans-

kripte legt nahe, daß REM1 und REM3 mit anderen Sequenzen kotranskribiert werden, wogegen REM2 Transkripte möglicherweise vollständig aus der klonierten Sequenz selbst entstehen. Auf Grund der vorliegenden Daten ist nicht klar von welcher Klasse oder Klassen von Polymerasen die REM Sequenzen transkribiert werden. Die Größe der REM1 und REM2 Transkripte läßt auf Polymerase II schließen (Transkription durch Polymerase I ist unwahrscheinlich auf Grund fehlender Sequenzhomologie zu den ribosomalen Genen; die bekannten Polymerase III Transkripte sind kleiner), dagegen könnte REM2 auch von Polymerase III transkribiert werden. Alle REM Fragmente weisen jedoch keine Promotorelemente, insbesondere nicht die Polymerase III Promotorboxen A und B (Traboni et al., 1982) auf. Diese müßten dann außerhalb der klonierten Fragmente liegen. Da allen REM Sequenzen offene Translationslesesinne fehlen, müssen im Fall von Polymerase II Transkription die REM Elemente in intervenierenden Sequenzen nuklearer mRNA Vorläufer oder an den nicht translatierten 3' und 5' Enden reifer mRNAs liegen. Repetitive Elemente in polyadenylierter RNA sind aus verschiedenen Organismen bekannt, bzw. aus Dictyostelium discoideum (Zuker & Lodish, 1981), Maus (Brickell et al., 1983) und Xenopus (Spohr et al., 1982; siehe Kap. repetitive Elemente in cDNAs) und in Zusammenhang mit der Regulation der Genexpression gebracht worden. Obwohl möglicherweise eine Zufallsverteilung von REM Sequenzen in stadienspezifisch exprimierten Genen besteht, sind sie gerade wegen ihrer Trans-

kription in Hinsicht auf Modelle der koordinierten Genregulation interessant (Davidson & Britten, 1979).

4.3 Die RHM Sequenzen

Eine sichtbare 0,75 KBP Bande nach Gelelektrophorese Hind III verdauter Xenopus laevis Genom DNA besteht aus zwei Hauptkomponenten, den Monomeren zweier Satelliten DNAs. Eine Komponente, die in dieser Arbeit als RHM1 oder RHM4 Fragment kloniert wurde, ist mit der oozytenspezifischen 5S DNA identisch. Die andere Komponente stellt eine neue Art von Xenopus Satelliten DNA dar, die kürzlich auch als Satellit 1 DNA (Lam & Carroll, 1983), X. 1. 741 Element (Jamrich et al., 1983), oder als OAX DNA (Ackerman, 1983) beschrieben wurde.

Absorbtionsmessungen ergaben für die Menge DNA, die während der Elektrophorese innerhalb der 0,75 KBP Hind III Bande wandert, einen Wert von 0,7 - 1% der DNA Gesamtmenge. Dagegen liegen die Quantifizierungen gemäß den "dot - blot" Analysen bei 0,5% für die oozytenspezifische 5S DNA und bei 1,35% für die RHM2 Elemente. Das entspricht einer Summe von 1,85%. Dieser Unterschied mag eine Erklärung dadurch finden, daß die Satelliten DNAs nicht in ihrer Gesamtheit in Monomere gespalten werden (vergleiche Abbildung 18; es existieren die 1,05 KBP Bande, Dimere, Trimere und wenig Tetramere), und daß unter den verwendeten Waschbedingungen (0,1 X SSC, 50°C) eine Kreuzhybridisierung mit anderen verwandten Sequenzen nicht

ausgeschlossen werden kann. Sicherlich ist es extrem unwahrscheinlich, daß andere Sequenzelemente signifikant zur Bildung der 0,75 KBP Bande beitragen, die daher zu 25% - 30% aus oozytenspezifischer 5S DNA und zu 70% - 75% aus RHM2 Sequenzen besteht.

Die direkte Klonierung von DNA Fragmenten aus der 0,75 KBP Bande stellt also eine einfache Alternative dar, oozytenspezifische 5S DNA zu isolieren, da wenigstens 1/4 der zu erwartenden Transformanten 5S Gene enthalten werden. Auf diese Weise werden aufwendige Reinigungsschritte, wie isopyknische Zentrifugation in Ag^{+}/Cs_2SO_4- oder CsCl/Actinomycin D Gradienten vermieden (Brown et al., 1971). Die Sequenzanalyse zweier 5S DNA Monomere (RHM1 und RHM4) ergab signifikante Größenunterschiede zwischen beiden Fragmenten. Diese gehen hauptsächlich auf die bekannten Differenzen in den A/T reichen "spacer" Regionen zurück (Carroll & Brown, 1976). Andererseits läßt der Sequenzvergleich aber eine bislang unbekannte Pentanucleotid Deletion in der G/C reichen Region von RHM1 erkennen, von der die Pseudogenregion direkt betroffen ist (Abbildung 35). Ob dieses Resultat lediglich für verringerten Selektionsdruck während der Evolution spricht, oder ob hierin eine biologische Bedeutung liegt, kann auf Grund der vorliegenden Daten nicht geklärt werden. Innerhalb der codierenden Region selbst kann lediglich ein einziger Nucleotidaustausch beobachtet werden (Abbildung 35). Der korrespondiert zu den bekannten 5S Gen Sequenzheterogenitäten, die eine microheterogene RNA Popula-

Abbildung 35: Sequenzvergleich der G/C reichen Regionen der oozytenspezifischen 5S DNA Monomere aus RHM1 und RHM4. Die RHM1 Sequenz (oben) und die RHM4 Sequenz (unten) sind für maximale Homologie gegenübergestellt. Lücken bezeichnen Deletionen. Die Gen- (A) und Pseudogenregionen (B) sind eingekastelt. Die Nucleotide jeweils nur eines Stranges sind in 5' - 3' Richtung gezeigt. Senkrechte Striche kennzeichnen Nucleotidaustausche.

tion zur Folge haben (Miller et al., 1978).

Der Sequenzvergleich der RHM2 Sequenz zu dem 741 BP Element der Satellit 1 DNA (Lam & Carroll, 1983) weist eine 96,4%ige Homologie auf (6 Deletionen, 2 Insertionen, 19 Substitutionen). 96,1%ige Homologie wird zwischen RHM2 und dem OAX Monomer (Ackerman, 1983) beobachtet (2 Deletionen, 3 Insertionen, 24 Substitutionen). Da die OAX und Satellit 1 Elemente um 95,7% divergieren, kann geschlossen werden, daß sich die verschiedenen Elemente um ca. 4% auseinanderentwickelten. Dieser Wert ist erheblich höher als die 1% Divergenz für die RHM5 Konsensussequenz. Obwohl diese 1% eine Unterschätzung bedeuten könnten (Dies wird klar, wenn man bedenkt, daß die RHM5 Sequenz den Durchschnitt von 22 Elementen angibt; Substitutionen an einer Position innerhalb nur eines Elementes würden sicher nicht erkannt; das wird durch partielle Sequenzanalysen individueller 1,037 KBP Elemente aus cosXL30F1A12 (subkloniert und sequenziert in M13 mp8) erhärtet (Daten nicht gezeigt)), so sollte doch die Tatsache, daß zwischen den RHM5 Elementen aus cosXL30F1A12 keine Längenheterogenitäten, Insertionen und Deletionen auftreten, auf eine engere Homologie zwischen Elementen eines "clusters" als zwischen Elementen verschiedener "cluster" hinzudeuten. Vorausgesetzt das gilt auch für RHM2 Sequenzen, dann sollte zuerst die Verteilung von RHM Elementen über das Genom erfolgt sein. Anschließend erst hätte demzufolge die Amplifikation der Monomere in Multimere stattgefunden.

Die Analyse einer Bibliothek partieller Eco RI Fragmente von Xenopus laevis Genom DNA in Cosmiden führte zur Isolierung von sieben - aus einer großen Anzahl zufällig ausgewählter - Klone. Das Ergebnis der Kartierung sechs dieser Klone steht offenbar in Widerspruch zur Häufigkeit (siehe unten) der 1,05 KBP Elemente, denn nur je drei der Genom Klone tragen 0,75 KBP und je drei tragen 1,05 KBP Monomere. Dieser Widerspruch mag aber durch folgende Überlegung erklärt werden: Die meisten der 1,05 KBP Monomere weist Eco RI Schnittstellen auf, was zu einer Häufung von Eco RI Sequenzen innerhalb der betreffenden genomischen Regionen führt. Dies wiederum sollte unter Bedingungen des partiellen Abbaus, wie er zur Konstruktion der Genom Bibliothek verwendet wurde, zur schnellen Akkumulation gut klonierbarer Fragmente geeigneter Größe führen. Dagegen lassen die 0,75 KBP Elemente Eco RI Schnittstellen vermissen. Daraus resultieren ausgedehnte Genom Regionen mit sehr wenigen Eco RI Schnittstellen. Unter Bedingungen des partiellen Abbaus, bei dem nicht jede Erkennungssequenz gespalten wird, könnte zur Anreicherung 0,75 KBP RHM haltiger Genom Fragmente führen, die zu groß sind, um effizient kloniert werden zu können.

Besonders interessant erscheint der Klon cosXL25B6D1, denn er repräsentiert ein vollständiges "cluster" von RHM Elementen, das an beiden Seiten von DNA flankiert wird, die von RHM DNA verschieden ist. Daher ist hier die Möglichkeit gegeben, diejenigen Genom Regionen zu analysieren, in die die

RHM Elemente eingebettet sind.

Ein anderer mit der RHM2 Probe isolierter Genom Klon, cosXL25C4F10, zeigt ein unerwartet komplexes Muster an Restriktionsfragmenten. Er enthält einige wenige 0,75 KBP Monomere. Es kann im Augenblick keine endgültige Aussage darüber gemacht werden, in welcher Art und Weise diese Monomere organisiert sind. Vorläufige Daten (nicht gezeigt) lassen vermuten, daß in diesem Klon ein kleines "cluster" von 5 - 6 Monomeren vorliegt, das auf beiden Seiten von anderer DNA flankiert wird. Es ist jedoch evident, daß in diesem Klon RHM Sequenzen zusammen mit anderer repetitiver DNA, sowie mit Einzelgensequenzen vorkommen.

Aus dem Genom Klon cosXL30F1A12 wurde die 1,037 KBP Monomere isoliert. Eine 1,05 KBP Bande, die aller Wahrscheinlichkeit nach zu den RHM5 Monomeren aus cosXL30F1A12 korrespondiert, zeichnete sich schon in den Hind III Verdauungen von Xenopus laevis Genom DNA ab. Der Vergleich der Intensitäten der 1,05 KBP zu der 0,75 KBP Bande läßt das Mengenverhältnis an RHM5- zu RHM2 Sequenzen wie 1 : 10 erscheinen. Die RHM5 Sequenz unterscheidet sich von der RHM2 Sequenz hauptsächlich durch eine 287 BP Insertion. Der übrige Teil zeigt noch eine 84,3% Homologie zur RHM2 Sequenz. Die Insertion ist zwischen die Nukleotide 115/116 plaziert worden, obwohl eine Reihe von Sequenzvariationen zwischen den Nukleotiden 100 und 114 vorhanden sind. Die Analyse der 287 BP Insertion weist an ihrem Anfang und Ende Blöcke von etwa 55 Nukleotiden aus,

die eine mehr als 75%ige Homologie jeweils zu den Positionen 1 - 56 und 57 - 111/112 der RHM2 oder der RHM5 Sequenz aufweisen. Die zusätzlichen 170 BP zwischen diesen Sequenzblökken lassen keine weiteren Homologien erkennen. Die flankierenden direkten repetierten Hexanukleotidblöcke sprechen für ein mobiles Element, das durch seine Insertion die direkten repetierten Hexanukleotidblöcke schuf. Offensichtlich ist die insertierte Sequenz reich an Homonukleotiden, wie sie auch zwischen den Positionen 700 - 980 vorhanden sind. Insertionen in Satelliten DNAs sind auch in anderen Systemen bekannt geworden. So wurde die Integration eines einzigen Alu Elementes pro monomerer Einheit in die geschlechtsspezifische Form der menschlichen Satelliten 1 DNA beschrieben (Frommer et al., 1984). Ferner ist eine Alu Kopie in eine Satelliten DNA des "African Green Monkey" insertiert (Grimaldi & Singer, 1982). In Rindern ist eine retrovirusähnliche, tandemartige repetierte Struktur bekannt, die in andere Satelliten DNA eingebettet ist (Streek, 1982). In Drosophila ist die Insertion des B104 Elementes (Scherer et al., 1982) in 5S DNA "cluster" beschrieben, die zu Deletionen am Ort der Insertion und damit zur genetischen Variabilität führt (Tschudi et al., 1982). Im Gegensatz dazu bedingt das 170 BP Insertionselement in RHM5 Sequenzverdoppelungen, die natürlich auch eine genetische Variation bedeuten.

Es liegt nahe anzunehmen, daß die RHM5 Sequenzen den Typ von 1,05 KBP Monomeren repräsentieren, die auch von Lam und

Carroll (1983) beobachtet worden sind. Diese Autoren benutzten elektronenmikroskopische Analysen von Heteroduplexen zwischen 1,05 KBP und 0,75 KBP Elementen, um den Insertionsort zu bestimmen. Ihre Daten stimmen mit den hier gezeigten, soweit es die Meßgenauigkeit der Elektronenmikroskopie zu beurteilen erlaubt, überein. Dabei ist der von Lam und Carroll isolierte Genom Klon, aus dem das analysierte Monomer stammt, völlig verschieden von den in dieser Arbeit isolierten Klonen (1,05 KBP Monomere existieren vermengt inmitten von 0,75 KBP Elementen und weisen keine Eco RI Schnittstelle auf). Es bleibt fraglich, ob die insertierten Elemente in den 1,05 KBP Monomeren der vier beschriebenen "cluster" identisch sind, zumal auch von Lam und Carroll eine andere Insertion beschrieben wird, die in ein 1,0 KBP Element resultiert und die gerade am anderen Ende des Monomers lokalisiert ist. Die die 1,05 KBP Einheiten enthaltenen Klone liefern nach Restriktionsverdauung mit Alu I, Hae III und Hinf I identische Multikopie Banden (Daten nicht gezeigt), d.h. auch die Schnittstellen innerhalb der zusätzlichen 287 Nukleotide in RHM5 liegen identisch. Dies ist starke Evidenz für die Identität der Insertionen innerhalb der einzelnen 1,05 KBP "cluster".

Die RHM2 und RHM5 Sequenzen wurden mit mehr als 50 publizierten Xenopus Sequenzen verglichen. Dabei wurden starke Homologien zu tRNA codierenden Genen, insbesondere zu denen für $tRNA^{Met}$ (Clarkson et al., 1978), $tRNA^{Phe}$, $tRNA^{Tyr}$ (Müller & Clarkson,1980) und $tRNA^{Leu}$ (Galli et al., 1981). Ab-

bildung 36 zeigt einen Computervergleich zwischen $tRNA^{Tyr}$ und RHM2. Die Nucleotide 365 - 449 von RHM2, sowie die Nucleotide 650 - 734 von RHM5 können perfekt dem Kleeblatt Modell angepaßt werden (Schimmel et al., 1979; Gauss & Sprinzel, 1983; vergleiche Abbildung 37). Dabei stellen die Positionen 401 - 406 in RHM2 und 686 - 691 in RHM5 Intronsequenzen dar. Die Positionen der Introns entsprechen denen in mehreren anderen tRNA Genen (Gauss & Sprinzel, 1983). Es besteht noch eine andere Anpassung der RHM2 und RHM5 Elemente an das Kleeblatt Modell: Wenn die Nucleotide 401 - 412 (RHM2) oder 686 - 697 (RHM5) als intervenierende Sequenzen betrachtet werden, was allerdings den "extra loop" auf 5 Nucleotide reduziert. Beide hypothetischen tRNA Regionen würden einen Teil der OAX DNA ausmachen, der nach Injektion somatischer Zellkerne in Oozyten oder in in - vitro Extrakten transkribiert wird. Die unabdingliche Präsenz bestimmter Nucleotide an bestimmten Positionen weist weiterhin auf eine enge Verwandtschaft der RHM2 und RHM5 Elemente zu tRNA Genen hin, wenn auch einige Nucleotide in den "stems" nicht basenpaaren. Die Anticodons der hypothetischen tRNAs (CTG & ATG) weisen sie als Glutamin und Histidin akzeptierende tRNAs aus. Die auffälligen strukturellen Ähnlichkeiten und Sequenzhomologien erheben die Frage, ob die RHM Elemente in authentische tRNA Vorläufer transkribiert werden. Polymerase III Transkription von OAX DNA resultiert in 181 Nucleotid RNAs, die für tRNA Vorläufer viel zu groß sind. Die Injektionsexperimente dieser Arbeit zeigen

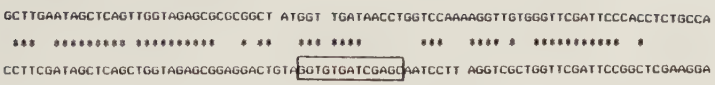


Abbildung 36: Sequenzvergleich zwischen RHM2 (oben) und der transkribierten Region von $tDNA^{Tyr}$ (unten). Sterne bezeichnen homologe Nucleotide. Die intervenierende Sequenz in $tDNA^{Tyr}$ ist eingekastelt.

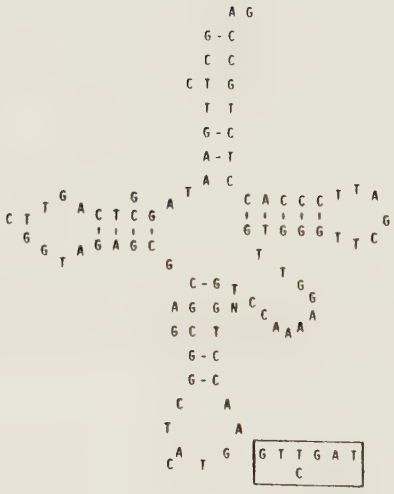


Abbildung 37: Hypothetisches Kleeblatt Modell der Nucleotide 365 - 449 (RHM2) oder der Nucleotide 650 - 734 (RHM5). Die gezeigte Sequenz ist von RHM2. Nucleotidaustausche zu RHM5 sind ebenfalls dargestellt. Mögliche intervenierende Sequenzen sind eingekastelt.

jedoch, daß nach langer Inkubationszeit RNA Transkripte von tRNA Größe akkumulieren, die sicher nicht auf Transkription von Vector Sequenzen zurückzuführen sind.

Die Polymerase III Promotoren in RHM2 und RHM5 sind aller Wahrscheinlichkeit nach aktiv, da die relevanten Positionen des geteilten Promotors nicht mutiert sind, was zu einer Inaktivierung der Gene führen würde (Folk & Hofstetter, 1983), insbesondere, weil Xenopus Oozyten "supercoiled" DNA in Chromatin verpacken können und damit ein der in - vivo Situation ähnliches Template entsteht (Wittig & Wittig, 1982; Wyllie et al., 1978). Wenn also potentielle Initiation der Transkription stattfinden kann, so ist jedoch kein möglicher Polymerase III Terminator (4 und mehr aufeinanderfolgende Ts; Bogenhagen & Brown, 1981) innerhalb konventioneller Abstände (1 - 30 Nucleotide) vom Ende der hypothetischen tRNA codierenden Regionen in RHM2 und RHM5 vorhanden. Ein starker Terminator liegt 90 Nucleotide abwärts, der zu dem tatsächlich beobachteten Transkript von ca. 180 Nucleotiden führt. Das 130 Nucleotid Transkript, das nach kurzer Inkubation nach Injektion von cosXL30F1A12 beobachtet wird, rührt wahrscheinlich vom Gebrauch eines schwachen Terminators von nur 3 Ts her, die in RHM5 aber nicht in RHM2 etwa 35 Nucleotide abwärts des hypothetischen tRNA Endes liegen. Warum im Verlauf der Inkubation vom 3T Terminator zum 6T Terminator umgeschaltet wird, bleibt unklar. Möglicherweise ist eine natürliche Verpackung der injizierten DNA in Chromatin erfolgt. So ist beispiels-

weise exakte Transkription von 5S Pseudogenen nach Injektion in Froschoozyten beobachtet worden. Keine Transkripte definierter Länge werden dagegen für die in - vivo Transkription nachgewiesen. Der Unterschied wird durch ineffiziente Termination in - vivo erklärt (Miller & Melton, 1981). Obwohl keine experimentellen Daten vorliegen, scheint es doch vernünftig anzunehmen, daß die beobachteten 4S Transkripte durch "processing" der 180 oder 130 Nucleotidtranskripte entsteht. Nuclease S_1 Kartierungen, sowie Reinjektion isolierter 180 oder 130 Nucleotidtranskripte sollten helfen, diese Fragen aufzuklären.

Das Vorkommen von tDNA oder tDNA ähnlichen Sequenzen in Satelliten DNA ist noch aus einem anderen Grund interessant. In Hefe sind die repetitiven Elemente "sigma" und "TY" mit tRNA Genen assoziiert (Del Rey et al., 1982; Brodeur et al., 1983), die wiederum in der Nachbarschaft von Replikationsursprüngen gefunden werden (Feldmann et al., 1981). Auch in den Genomen von Xenopus laevis Mitochondrien sind tRNA Gene mit Replikationsursprüngen assoziiert (Wong et al., 1983). Die Assoziation von tDNA oder tDNA ähnlichen Sequenzen könnte das erste Beispiel solcher Organisation im Genom von Vertebraten sein.

Die in - vivo Transkription eines anderen RHM2 Homologs, des Xl 741 Elementes, ist von Gall und Mitarbeitern an Lampenbürstenchromosomen beobachtet worden. Vorläufige Daten weisen darauf hin, daß RHM2 Transkripte in den prävitellogeninen Oozyten der Stadien I und II, nicht aber während der Embryo-

genese, vorhanden sind (Knöchel et al., nicht publiziert). Vielleicht stellen RHM Sequenzen für die Oogenese spezifische tRNAs dar. Diese könnten gebraucht werden, um die großen Syntheseleistungen zu gewährleisten, die die Oozyte zum Speicher für die frühe Entwicklung machen. Andererseits mögen sich die RHM Sequenzen aus tRNA Genen während der Phylogenese entwickelt haben und eventuell noch unbekannte Funktionen während der Oogenese ausüben.

5. Zusammenfassung

Repetitive DNA Elemente aus dem Genom von Xenopus laevis wurden auf zwei Wegen isoliert. Der erste Weg führte über die Koloniehybridisierung von cDNA Klonen aus polyadenylierter Kern RNA des Gastrulastadiums von Xenopus Embryonen zur Identifizierung von acht repetitiven Elementen, die zu sieben Sequenzfamilien gehören. Alle acht Elemente sind im Genom vorwiegend dispers organisiert. Sieben Elemente gehören zur Klasse der mittelrepetitiven DNA, während das achte Sequenzelement mit ca. 160000 Kopien pro haploidem Genom der hochrepetitiven DNA zugerechnet werden sollte. Die Analyse des Transkriptionsverhaltens dieser Elemente zeigte, daß alle Sequenzen während der Embryonalentwicklung sehr stark transkribiert werden. Dabei ist die Expression einiger Elemente einer Regulation während der Embryogenese unterworfen. Ein Element ist nur in der Kern RNA nicht aber in polysomaler RNA zu finden. Die Sequenzanalyse für drei der repetitiven Sequenzen ergab, daß keine offenen Translationslesesinne vorhanden sind.

Der zweite Weg führte über die direkte Klonierung repetitiver DNA, die nach Abbau genomischer DNA mit Restriktionsenzymen und folgender Gelelektrophorese als distinkte Banden isoliert wurde. Aus einer 0,75 KBP Hind III Bande wurden zwei repetitive Elemente identifiziert, die Bestandteil von Satelliten DNA sind. Ein Element stellt die monomere Einheit

der oozytenspezifischen 5S DNA dar. Das andere, das als RHM2 bezeichnet wird, ist das Monomer einer neu entdeckten Satelliten DNA, die einen Anteil von 1,35% am Xenopus Genom hat. Die Analyse einer Bibliothek von Genomfragmenten mit der RHM2 Sequenz als Probe führte zur Identifizierung strukturell verschiedener Genomklone, von denen ein Teil aus 0,75 KBP und ein anderer Teil aus 1,05 KBP Monomeren besteht. Die Sequenzanalyse ergab, daß sich die 1,05 KBP Monomere von den 0,75 KBP Monomeren durch Insertion eines anderen DNA Elementes unterscheiden. Weiterhin zeigte die Nucleotidsequenz, daß ein Polymerase III Gen pro Monomer vorhanden ist. Durch die Transkription der 0,75 KBP und der 1,05 KBP Fragmente nach Injektion in Xenopus Oozyten wurde die Aktivität beider Promotoren unter in - vitro Bedingungen erwiesen. Während nach Injektion des 0,75 KBP Fragmentes ca. 180- und 75 Nucleotidtranskripte akkumulierten, resultierten aus den 1,05 KBP Fragmenten ca. 190 - 200-, 130- und 75 Nucleotidtranskripte.

Aus einer 0,5 KBP Eco RI Bande wurden drei verschiedene repetitive Elemente isoliert (REM1, REM2, REM3), die im haploiden Genom je mit ca. 25000, 5000 und 1200 Kopien vorhanden sind. Die REM1 Sequenzen, die lange terminale invertierte repetitive Sequenzblöcke aufweisen, sind im Genom dispers organisiert. Die REM2 Elemente liegen teilweise tandemartig wiederholt und teilweise dispers vor. Die REM3 Sequenz stellt die monomere Einheit einer Satelliten DNA dar. Die REM1 und die REM2 Sequenzen werden an den meisten Chromosomen gefun-

den, wobei die REM1 Sequenz bevorzugt an zentromerischen- und telomerischen Regionen lokalisiert ist. Die REM3 Elemente können dagegen an den langen Armen (nahe dem Zentromer) nur eines Chromosomenpaares nachgewiesen werden. Obwohl die Sequenzanalyse keine Hinweise auf Promotorelemente gab, werden alle drei REM Sequenzen in diskrete RNA Spezies transkribiert, wobei alle drei REM Elemente differentiell während der Embryogenese exprimiert werden.

So sind im Rahmen dieser Arbeit fast 4% der DNA des Genoms des Krallenfrosches Xenopus laevis charakterisiert worden. Dieser Anteil des Genoms gehört zu 11 verschiedenen repetitiven Elementen. Überraschenderweise konnte von allen repetitiven Elementen - selbst von den Satelliten DNAs - gezeigt werden, daß sie transkribiert werden, und daß die Transkription von wenigstens acht Elementen der Kontrolle der Embryonalentwicklung unterliegt.

6. Literaturverzeichnis

Ackerman, E.J. (1983) EMBO J. 2, 1417-1422.

Alwine, J.C., Kemp, D.J., Stark, G.R. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5350-5354.

Anachkova, B., Todorova, M., Vassilev, L., Russev, G. (1984) Eur. J. Biochem. 141, 105-108.

Aviv, H., Leder, P. (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 1408-1412.

Anderson, D.M., Richter, J.D., Chamberlin, M.E., Price, D.H., Britten, R.J., Smith, D., Davidson, E.H. (1982) J. Mol. Biol. 155, 281-309.

Balmain, A., Frew, L., Cole, G., Krumlauf, R., Ritchie, A., Birnie, G.D. (1982) J. Mol. Biol. 160, 163-179.

Bell, G.I., Pictet, R., Rutter, W.J. (1980) Nucleic Acids Res. 8, 4091-4109.

Birnboim, H.C., Doly, J. (1979) Nucleic Acids Res. 7, 1513-1523.

Bittner, M., Kupferer, P., Morris, C.F. (1980) Anal. Biochem. 102, 459-471.

Blin, N., Stafford, D.W. (1976) Nucleic Acids Res. 3, 2303-2308.

Bogenhagen, D.F., Brown, D.D. (1981) Cell 24, 261-270.

Bolivar, F., Rodriguez, R.C., Greene, P.J., Betlach, M.C., Heynecker, H.L., Boyer, H.W., Crossa, J.H., Falkow, S. (1977) Gene 2, 95-113.

Bolivar, F., Backman, K. (1979) Methods Enzymol. 68, 245-267.

Boyer, H.W., Roulland-Dussoix, D. (1969) J. Mol. Biol. 41, 459-472.

Brickell, P.M., Latchman, D.S., Murphy, D., Wilson, K., Rigby,W.J. (1983) Nature 306, 756-760.

Bristow, D.A., Deuchar, E.M. (1964) Exp. Cell. Res. 35, 580-589.

Britten, R.J., Kohne, D.E. (1968) Science 161, 529-540.

Britten, R.J., Davidson, E.H. (1969) Science 165, 349-357.

Britten, R.J., Davidson, E.H. (1979) Science 204, 1052-1059.

Brodeur, G.M., Sandmeyer, S.B., Olson, M.V. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 3292-3296.

Brown, D.D., Wensink, P.C., Jordan, E. (1971) Proc. Natl. Acad. Sci USA 68, 3175-3179.

Brownlee, G.G., Cartwright, E.M. (1974) J. Mol. Biol. 89, 703-718

Brutlag, D. (1980) Ann. Rev. Gent. 14, 121-144.

Calabretta, B., Robberson, D.L., Barrera-Saldaña, H.A., Lambrou, T. P., Saunders, G.F. (1982) Nature 296, 219-225.

Carmichal, G.G., McMaster, G.K. (1980) Meth. Enzym. 65, 380-391.

Carpenter, C.D., Bruskin, A.M., Spain, L.M., Eldon, E.D., Klein, W.H. (1982) Nucleic Acids Res. 10, 7829-7842.

Carroll, D., Brown, D.D. (1976) Cell 7, 467-475.

Chamberlin, M.E., Britten, R.J., Davidson, E.H. (1975) J. Mol. Biol. 96, 317-333.

Chambers, J.C., Watanabe, S., Taylor, H.J. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 5572-5576.

Childs, G., Maxson, R., Cohn, R.H., Kedes, L. (1981) Cell 23, 651-663.

Chung, S., Zuker, C., Lodish, H.F. (1983) Nucleic Acids Res. 11, 4835-4852.

Clarkson, S.G., Kurer, V., Smith, H.O. (1978) Cell 14, 713-724.

Constantini, F.D., Scheller, R.H., Britten, R.J., Davidson, E.H. (1978) Cell 15, 173-187.

Constantini, F.D., Britten, R.J., Davidson, E.H. (1980) Nature 287, 111-117.

Crampton, J.M., Davies, K.E., Knapp, T.F. (1981) Nucleic Acids Res. 9, 3821-3834.

Davidson, E.H., Britten, R.J. (1973) Q. Rev. Biol. 48, 565-613.

Davidson, E.H., Hough, B.R., Amenson, C.S., Britten, R.J. (1973) J. Mol. Biol. 77, 1-23.

Davidson, E.H., Posakony, J.W. (1982) Nature 297, 633-635.

Dawid, I.B. (1965) J. Mol. Biol. 12, 581-599.

de Lange, T., Michels, P.A.M., Veerman, H.J.G., Cornelissen, W.C.A. Borst, P. (1984) Nucleic Acids Res. 12, 3777-3790.

Del Rey, F.J., Donahue, T.F., Fink, G.R. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 4138-4142.

Denhardt, D.T. (1966) Biochem. Biophys. Res. Commun. 23, 435-448.

Derman, E., Krauter, K., Walling, C., Weinberger, C., Ray, M., Darnell, J.E. (1981) Cell 23, 731-739.

Dina, D., Crippa, M., Beccari, E. (1973) Nature New Biology 242, 101-105.

Dina, D., Meza, I., Crippa, M. (1974) Nature 248, 486-490.

Doolittle, W.F., Sapienza, C. (1980) Nature 284, 601-603.

Dumont, J.N. (1972) J. Morphol. 136, 155-179.

Eden, F.C., Hendrick, J.P., Gottlieb, S.S. (1978) Biochemistry 17, 5113-5121.

Federoff, N., Wellauer, P.K., Wall, R. (1977) Cell 10, 597-610.

Federoff, N.V., Brown, D.D. (1978) Cell 13, 701-716.

Feldmann, H., Olah, J., Friedenreich, H. (1981) Nucleic Acids Res. 9, 2949-2970.

Finnegan, D.J., Rubin, G.M., Yong, M.W., Hogness, D.S. (1978) Cold Spring Harbor Sym. Quant. Biol. 42, 1053-1063.

Firtel, R.A., Kindle, K. (1975) Cell 5, 401-411.

Flytzanis, C.N., Brandhurst, B.P., Britten, R.J., Davidson, E.H. (1982) Develop. Biol. 91, 27-35.

Folk, W.R., Hofstetter, H. (1983) Cell 33, 585-593.

Frommer, M., Prosser, J., Vincent, P.C. (1984) Nucleic Acids Res. 12, 2887-2900.

Gall, J.G., Cohen, E.H., Atherton, D.D. (1973) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 38, 417-421.

Galli, G., Hofstetter, H., Birnstiel, M.L. (1981) Nature 294, 626-631.

Gauss, D.H., Sprinzel, M. (1983) Nucleic Acids Res. 11, r1-r53.

Gauss, D.H., Sprinzel, M. (1983) Nucleic Acids Res. 11, r55-r103.

Gergen, J.P., Stern, R.H., Wensink, P.G. (1979) Nucleic Acis Res. 7, 2115-2136.

Graham, D.E., Neufeld, B.R., Davidson, E.H., Britten, R.J. (1974) Cell 1, 127-137.

Graham, D.E., Schanke, K.E. (1980) Nucleic Acids Res. 8, 3875-3894.

Green, R.A., Flickinger, R.F. (1970) Biochim. Biophys. Acta 217, 447-460.

Grimaldi, G., Singer, M.F. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 1497-1500.

Grunstein, M., Hogness, D.S. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 3961-3965.

Grunstein, M., Wallis, J. (1979) Meth. Enzym. 68, 379-389.

Gurdon, J.B. (1974) The control of gene expression in animal development. Claredon Press.

Henning, W. (1973) Intern. Rev. of Cytol. 36, 1-44.

Holoubek, V., Tiedemann, H. (1978) Wilhelm Roux's Arch. 184, 171-180.

Holtfreter, J. (1931) Wilhelm Roux's Arch. 124, 404-466.

Hosbach, H.A., Wyler, T., Weber, R. (1983) Cell 32, 45-53.

Igo-Kemenes, T., Hörz, W., Zachau, H.G. (1982) Ann. Rev. Biochem. 51, 89-121.

Jagadeeswaran, R., Forget, B.G., Weissman, S.M. (1981) Cell 26, 141-142.

Jelinek, W.R., Molloy, G.R., Fernandez-Mamoz, R., Salditt-Georgieff M., Darnell, J.E. (1974) J. Mol. Biol. 82, 361-370.

Jelinek, W.R., Evans, R., Wilson, M., Salditt-Georgieff, M., Darnell, J.E. (1978) Biochemistry 17, 2776-2783.

Jelinek, W.R., Toomey, T.P., Leinwand, L., Duncan, C.H., Biro, P.A., Choudary, P.V., Weissman, S.M., Rubin, C.M., Houch, C.M., Deininger, P.L., Schmid, C.W. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 1398-1402.

Jelinek, W.R., Schmid, C.W. (1982) Ann. Rev. Biochem. 51, 813-844.

John, M.E., Meyerhof, W., Knöchel, W. (1982) in: Embryonic Development. Part A: Genetic Aspects (Burger, M.M., Weber, R.; eds) 149-158. Alan R. Liss, Inc., New York.

John, M.E., Knöchel, W. (1983) Naturwissenschaften 70, 241-246.

Kafatos, F., Jones, C.W., Efstratiadis, A. (1979) Nucleic Acids Res. 7, 1541-1552.

Kay, B.K., Dawid, I.B. (1983) J. Mol. Biol. 170, 583-596.

Kimmel, A.R., Firtel, R.A. (1979) Cell 16, 787-796.

Kindle, K.L., Firtel, R.A. (1979) Nucleic Acids Res. 7, 2403-2422.

Kleckner, N. (1981) Ann. Rev. Genet. 15, 341-404.

Knöchel, W., Bladauski, D. (1980) Wilhelm Roux's Arch. 188, 187-193.

Knöchel, W., Bladauski, D. (1981) Wilhelm Roux's Arch. 190, 97-102.

Krayev, A.S., Kramerov, D.A., Skryabin, K.G., Ryskov, A.P., Bayev, A.A., Georgiev, G.P. (1980) Nucleic Acids Res. 8, 1201-1215.

Kressmann, A., Birnstiel, M.L. (1980) in: Transfer of cell constituents into eukaryotic cells, eds. Celis, J.E., Grässmann, A., Loyter, A. (Plenum Press) Vol. 31, pp. 383-407.

Lam, B.S., Carrol, D. (1983) J. Mol. Biol. 165, 567-585.

Larson, R., Messing, J. (1982) Nucleic Acids Res. 10, 39-49.

Lerner, M.R., Boyle, A., Mount, S.M., Wolin, S.L., Steitz, J.A. (1980) Nature 283, 220-224.

Lewin, B. (1980) Gene Expression, Vol. 2, London, Wiley.

Long, E.O., Dawid, I.B. (1980) Ann. Rev. Biochem. 49, 727-764.

Manning, J.E., Schmid, C.W., Davidson, N. (1975) Cell 4, 141-155.

Maxam, A.M., Gilbert, W. (1980) Meth. Enzym. 65, 499-560.

Messing, J., Vieira, J. (1982) Gene 19, 269-276.

Meyerhof, W. (1980) Klonierung von cDNA aus polyadenylierter Kern RNA des Gastrulastadiums von Xenopus laevis. Diplomarbeit, Freie Universität Berlin.

Meyerhof, W., John, M.E., Knöchel, W. (1982) Wilhelm Roux's Arch. 191, 366-370.

Miller, J.R., Cartwright, E.M., Brownlee, G.G., Federoff, N.V., Brown, D.D. (1978) Cell 13, 717-725.

Miller, J.R., Melton, D.A. (1981) Cell 24, 829-835.

Müller, F., Clarkson, G. (1980) Cell 19, 345-353.

Newport, J., Kirschner, M. (1982a) Cell 30, 675-686.

Newport, J., Kirschner, M. (1982b) Cell 30, 687-696.

Nieuwkoop, P.D., Faber, J. (1956) Normal table of Xenopus laevis (Daudin) North Holland, Amsterdam.

Orgel, L.E., Crick, F.H.C. (1980) Nature 284, 604-607.

Pardue, M.L., Gall, J.G. (1975) Meth. Cell. Biol. 10, 1-16.

Perlman, S., Phillips, C., Bishop, J.O. (1976) Cell 8, 33-42.

Perlman, S., Rosbash, M. (1978) Develop. Biol. 63, 197-212.

Posakony, J.W., Scheller, R.H., Anderson, D.M., Britten, R.J., Davidson, E.H. (1981) J. Mol. Biol. 149, 41-67.

Posakony, J.W., Flytzanis, C.N., Britten, R.J., Davidson, E.H. (1983) J. Mol. Biol. 167, 361-390.

Probst, E., Kressmann, A., Birnstiel, M.L. (1979) J. Mol. Biol. 135, 709-732.

Rave, N., Ckoenjakou, R., Boedtker, H. (1979) Nucleic Acids Res. 6, 3559-3567.

Reeder, R.H. (1980) In Genetic Engineering Principles and Methods (Setlow, J.K., Hollander, A. eds.) Vol. 1, pp. 93-116, Plenum Press, New York.

Richter, J.D., Smith, L.D., Anderson, D.M., Davidson, E.H. (1984) J. Mol. Biol. 173, 227-241.

Ryffel, G.U., Muellener, D.B., Gerber-Huber, S., Wyler, T., Wahli, W. (1983) Nucleic Acids Res. 11, 7701-7716.

Ryskov, A.P., Saunders, G.F., Farashyan, V.R., Georgiev, G.P. (1973) Biochim. Biophys. Acta 312, 152-164.

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467.

Sanger, F., Coulson, A.R. (1978) FEBS Lett. 87, 107-110.

Scheller, R.H., Constantini, F.D., Kozlowski, M.R., Britten, R.J., Davidson, E.H. (1978) Cell 15, 189-203.

Scherer, G., Tschudi, C., Perera, J., Delius, H., Pirotta, V. (1982) J. Mol. Biol. 157, 435-451.

Schimmel, P.R., Söll, D., Abelson, J.N., eds. (1979) Transfer-RNA: Structure, Properties and Recognition, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y., 518-519.

Schmid, C.W., Deininger, P.L. (1975) Cell 6, 345-358.

Schmid, C.W., Jelinek, W.R. (1982) Science 216, 1065-1070.

Shapiro, J.A. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 1933-1937.

Shepard, G.W., Flickinger, R.A. (1982) Wilhelm Roux's Arch. 191, 1-4.

Singer, M.F. (1982) Int. Rev. Cyt. 76, 67-112.

Smith, M.J., Hough, B.R., Chamberlin, M.E., Davidson, E.H. (1974) J. Mol. Biol. 85, 103-126.

Southern, E.M. (1975) J. Mol. Biol. 98, 503-517.

Spohr, G., Reith, W., Sures, I. (1981) J. Mol. Biol. 151, 573-592.

Spohr, G., Reith, W., Crippa, M. (1982) Develop. Biol. 94, 71-78.

Starlinger, P., Saedler, H. (1976) Curr. Top. Microbiol. Immunol. 75, 111-152.

Streek, R.E. (1982) Nature 298, 767-769.

Sutcliffe, J.G., Milner, R.J., Gottesfeld, J.M., Lerner, R.A. (1984) Nature 308, 237-241.

Tchurikov, N.A., Naumova, A.K., Zelentsova, E.S., Georgiev, G.P. (1982) Cell 28, 365-373.

Thomas, P. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 5201-5205.

Traboni, C., Ciliberto, G., Cortese, R. (1982) EMBO J. 1, 415-420.

Truett, M.A., Jones, R.S., Potter, S.S. (1981) Cell 24, 753-763.

Tschudi, C., Pirotta, V., Junakovic, N. (1982) EMBO J. 1, 977-985.

Tymowska, J., Kobel, H.R. (1972) Cytogenetics 11, 270-278.

Wakefield, L., Ackerman, E.J., Gurdon, J.B. (1983) Develop. Biol. 95, 468-475.

Warner, J.R., Souro, R., Birnboim, H.G., Girad, M., Darnell, J.E. (1966) J. Mol. Biol. 19, 349-361.

Weiss, B., Jaquemin-Sablon, A., Live, T.R., Fareed, C.G., Richardson, C.C. (1968) J. Biol. Chem. 243, 4543-4555.

Wittig, S., Wittig, B. (1982) Nature 297, 31-38.

Wold, B.J., Klein, W.H., Hough-Evans, B.R., Britten, R.J., Davidson, E.H. (1978) Cell 14, 941-950.

Wong, J.F.H., Ma, D.P., Roe, B.A. (1983) Nucleic Acids Res. 11, 4977-4993.

Wyllie, A. H., Laskey, R.A., Finch, J., Gurdon, J.B. (1978) Develop. Biol. 64, 178-188.

Wyman, A.R., White, R. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 6754-6758.

Yamamoto, K.R., Alberts, B.M., Benzinger, R., Conhorne, L., Treiber, G. (1970) Virology 70, 734-741.

Zannis-Hadjopoulos, M., Persico, M., Martin, R.G. (1981) Cell 27, 155-163.

Zuker, C., Lodish, H.F. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 5386-5390.

Tabellarischer Lebenslauf

- geboren am 9.3.1953 in Hannover
- meine Eltern sind der Industriekaufmann Helmut Meyerhof und die Hausfrau Ingrid Meyerhof (geb. Abel)
- eingeschult zu Ostern 1960 in die Alemannschule in Hannover
- Ostern 1964 Wechsel auf das Gymnasium Leibnizschule
- ab Ostern 1965 infolge eines Wohnungswechsels Besuch der Lutherschule
- Mai 1973 Erlangen der allgemeinen Hochschulreife
- Juli 1973 bis Juni 1975 Dienstzeit bei der Bundeswehr
- Oktober 1975 bis März 1976 Studium der Chemie an der TU Hannover
- April 1976 Wechsel an die FU Berlin und Beginn des Biochemiestudiums
- Oktober1978 Abschluß des Grundstudiums mit dem Vordiplom
- Oktober 1980 bis Juli 1981 Durchführung der Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von Professor Dr. Dr. Knöchel am Institut für Molekularbiologie und Biochemie der FU Berlin
- Juli 1981 Abschluß des Biochemiestudiums mit dem Diplom
- seit August 1981 Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Arbeitsgruppe von Professor Dr. Dr. Knöchel
- seit Juli 1982 verheiratet mit der Medienwissenschaftlerin Heike Höpken-Meyerhof (geb. Höpken)
- April 1983 bis Juni 1983 Forschungsaufenthalt bei Professor Dr. Weber am Zellbiologischen Zentrum der Universität Bern als EMBO - Stipendiat